

BEST AVAILABLE COPY



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 21 JUN 2004

WIPO

PCT

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 200300751 que tiene fecha de presentación en este Organismo el 31 de Marzo de 2003.

Madrid, 18 de Mayo de 2004

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

P.D.

CARMEN LENCE REIJA



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

INSTANCIA DE SOLICITUD

NUMERO DE SOLICITUD

P20 03007 51

03 MAR 31 12:27

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN:

CÓDIGO

MADRID

28

(1) MODALIDAD:

☒ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(2) TIPO DE SOLICITUD:

☐ ADICIÓN A LA PATENTE

☐ SOLICITUD DIVISIONAL

☐ CAMBIO DE MODALIDAD

☐ TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA

☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:

MODALIDAD

Nº SOLICITUD

FECHA SOLICITUD

(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL

CONSEJO SUP. INVESTIG. CIENTÍFICAS

BIONOSTRA, S.L.

NOMBRE

NACIONALIDAD

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

CÓDIGO PAÍS

ES

ES

DNI/CIF

Q2818002D

CNAE

PYME

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO SERRANO, 117

LOCALIDAD MADRID

PROVINCIA MADRID

PAÍS RESIDENCIA ESPAÑA

NACIONALIDAD ESPAÑOLA

TELÉFONO 91 5855000

FAX 91 5855287

CORREO ELECTRÓNICO ott@csic.es

CÓDIGO POSTAL 28006

CÓDIGO PAÍS ES

CÓDIGO PAÍS ES

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Dpto. SECRETARÍA GENERAL
REPROGRAFÍA
Panamá, 1 - Madrid 28071

(7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

RODRIGUEZ AGUIRRE

GONZÁLEZ DE LLANO

OÑA BLANCO

NOMBRE

JOSÉ FCO

DOLORES

ANA Mª

NACIONALIDAD

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

ESPAÑOLA

CÓDIGO

PAÍS

ES

ES

ES

(8)

☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

☒ INVENC. LABORAL

☐ CONTRATO

☐ SUCESIÓN

(10) TÍTULO DE LA INVENCION:

PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES VACÍAS (VLPS) DEL VIRUS INDUCTOR DE LA BURSTITIS INFECCIOSA (IBDV), COMPOSICIONES NECESARIAS PARA SU PUESTA A PUNTO Y SU USO EN LA ELABORACIÓN DE VACUNAS FRENTE AL IBDV

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI

☒ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAÍS DE ORIGEN

CÓDIGO

PAÍS

NÚMERO

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

☐

(15) AGENTE /REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLENAR, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

☒ DESCRIPCIÓN Nº DE PÁGINAS: 25

☒ Nº DE REIVINDICACIONES: 3

☒ DIBUJOS, Nº DE PÁGINAS: 9

☒ LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PÁGINAS: 13

☒ RESUMEN

☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN

☒ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD

☒ HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS

☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN

☒ OTROS: AUTORIZACIÓN

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE



(VER COMUNICACIÓN)

FIRMA DEL FUNCIONARIO



NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Informacion@oepm.es

www.oepm.es

C/ PANAMÁ, 1 • 28071 MADRID

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

NÚMERO DE SOLICITUD

P200300751

FECHA DE PRESENTACIÓN

05 MAR 91 12:26

RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES VACÍAS (VLPS) DEL VIRUS INDUCTOR DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), COMPOSICIONES NECESARIAS PARA SU PUESTA A PUNTO Y SU USO EN LA ELABORACIÓN DE VACUNAS FRENTE AL IBDV

La presente invención describe un procedimiento de producción y obtención de VLPs completas de IBDV en células de insecto, así como construcciones genéticas, vector de expresión genética, baculovirus recombinante que permiten la puesta a punta de dicho procedimiento. Además, la presente invención describe el empleo de dichas VLPs de IBDV en la elaboración de vacunas para la enfermedad aviar denominada bursitis infecciosa.

GRÁFICO

(VER INFORMACIÓN)



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

HOJA DE INFORMACION COMPLEMENTARIA

NÚMERO DE SOLICITUD

P200500751

FECHA DE PRESENTACIÓN

03 MAR 31 12:28

☐ PATENTE DE INVENCION

☐ MODELO DE UTILIDAD

(5) SOLICITANTES:

APELLIDOS O
DENOMINACIÓN SOCIAL

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO
PAÍS

DNI/CIF

CNAE

PYME

(7) INVENTORES:

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

ABAITUA ELUSTONDO
MARAVAR MOLINA
CLEMENTE CERVERA
RUIZ CASTÓN
RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ-ALBA

FERNANDO
ANTONIO
ROBERTO
JOSÉ
JOSE R.

ESPAÑOLA
ESPAÑOLA
ESPAÑOLA
ESPAÑOLA
ESPAÑOLA

(12) EXPOSICIONES OFICIALES:

LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAÍS DE ORIGEN

CÓDIGO
PAÍS

NÚMERO

FECHA

NO CUMPLIMENTAR LOS REGUADROS ENMARCADOS EN ROJO



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

12

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

21	NÚMERO DE SOLICITUD
P200500751	
22	FECHA DE PRESENTACIÓN
62	PATENTE DE LA QUE ES DIVISORIA

31	NÚMERO	DATOS DE PRIORIDAD	32	FECHA	33	PAÍS
71	SOLICITANTE (S)					
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y BIONOSTRA, S.L. DOMICILIO SERRANO, 117 - 28006 MADRID						
NACIONALIDAD ESPAÑOLA						
72	INVENTOR (ES) JOSE FCO RODRÍGUEZ AGUIRRE, DOLORES GONZÁLEZ DE LLANO, ANA Mª OÑA BLANCO, FERNANDO ABAITUA ELUSTONDO, ANTONIO MARAVER MOLINA, ROBERTO CLEMENTE CERVERA, JOSÉ RUIZ CASTÓN Y JOSE R. RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ-ALBA					
51	Int. Cl.		GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)			
54	TÍTULO DE LA INVENCION					
PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES VACÍAS (VLPS) DEL VIRUS INDUCTOR DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), COMPOSICIONES NECESARIAS PARA SU PUESTA A PUNTO Y SU USO EN LA ELABORACIÓN DE VACUNAS FRENTE AL IBDV						
57	RESUMEN					
PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES VACÍAS (VLPS) DEL VIRUS INDUCTOR DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), COMPOSICIONES NECESARIAS PARA SU PUESTA A PUNTO Y SU USO EN LA ELABORACIÓN DE VACUNAS FRENTE AL IBDV La presente invención describe un procedimiento de producción y obtención de VLPs completas de IBDV en células de insecto, así como construcciones genéticas, vector de expresión genética, baculovirus recombinante que permiten la puesta a punta de dicho procedimiento. Además, la presente invención describe el empleo de dichas VLPs de IBDV en la elaboración de vacunas para la enfermedad aviar denominada bursitis infecciosa.						

TÍTULO

PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES VACÍAS (VLPs) DEL VIRUS INDUCTOR DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), COMPOSICIONES NECESARIAS PARA SU PUESTA A PUNTO Y SU USO EN LA ELABORACIÓN DE VACUNAS FRENTE AL IBDV

SECTOR DE LA TÉCNICA

La técnica se enmarca dentro del sector biotecnológico y su campo de aplicación dentro del sector de producción de vacunas para sanidad animal, y concretamente, la producción de partículas virales (VLPs) del IBDV mediante ingeniería genética y su uso en la elaboración de vacunas frente a la enfermedad aviar denominada bursitis infecciosa (IBD).

ESTADO DE LA TÉCNICA

Durante las últimas cuatro décadas del siglo XX se produjo la aparición y dispersión global de una enfermedad aviar denominada bursitis infecciosa (IBD). La IBD se caracteriza por la destrucción de las poblaciones de linfocitos pre-B que residen en la bolsa de Fabricio de los animales infectados (Sharma, J. M., I. J. Kim, S. Rautenschlein, and H. Y. Yeh 2000. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. Dev Comp Immunol. 24: 223-35). Esta enfermedad está causada por el virus de la bursitis infecciosa (IBDV) perteneciente a la familia *Birnaviridae* (Leong, J.C., D. B., P. Dobos, F.S.B. Kilbenge, J.E. Ludert, H. Muller,, and B. N. and 2000. Virus Taxonomy Seventh report of International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, CA). A pesar de la implementación de programas de vacunación intensivos, basados en el uso de combinaciones de vacunas vivas e inactivadas, se siguen reportando brotes de IBD en todos los países productores de carne de pollo (van den Berg, T. P., N. Eterradossi, D. Toquin, and G. Meulemans 2000. Infectious bursal disease (Gumboro disease). Rev Sci Tech. 19: 509-43).

Los viriones del virus de la bursitis infecciosa carecen de envuelta lipídica, presentan una estructura icosaédrica (simetría $T=13$), y tienen un diámetro de 65-70 nm (Bottcher, B., N. A. Kiselev, V. Y. Stel'Mashchuk, N. A. Perevozchikova, A. V. Borisov, and R. A. Crowther 1997. Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. J Virol. 71: 325-30; Caston, J. R., J. L. Martinez-Torrecuadrada, A. Maraver, E. Lombardo, J. F. Rodriguez, J. I. Casal, and J. L. Carrascosa 2001. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein vp2

is involved in definition of the t number for capsid assembly. J Virol. 75: 10815-28). La cápsida está formada por una única capa proteíca que contiene cuatro polipéptidos diferentes denominados VPX, VP2, VP3 y VP1, respectivamente. Las proteínas VPX, VP2 y VP3 se producen mediante procesamiento proteolítico de un precursor, denominado poliproteína viral, codificado por el segmento genómico A. La proteína VP1 se produce mediante expresión del gen correspondiente codificado en el segmento B.

La poliproteína viral, sintetizada como un precursor de 105 kiloDaltons (kDa), es procesada de forma cotraduccional dando lugar a la formación de tres polipéptidos denominados VPX, VP3 y VP4. VP4, un nuevo miembro de la familia, es responsable de este procesamiento (Birghan, C., E. Mundt, and A. E. Gorbalenya 2000. A non-canonical lon proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. Embo J. 19: 114-23). VP3 es un polipéptido de 29 KDa que forma subunidades triméricas que tapizan la capa interna de la cápsida (Bottcher, B., N. A. Kiselev, V. Y. Stel'Mashchuk, N. A. Perevozchikova, A. V. Borisov, and R. A. Crowther 1997. Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. J Virol. 71: 325-30 ; Caston, J. R., J. L. Martinez-Torrecuadrada, A. Maraver, E. Lombardo, J. F. Rodriguez, J. I. Casal, and J. L. Carrascosa 2001. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein vp2 is involved in definition of the t number for capsid assembly. J Virol. 75: 10815-28). VPX sufre un segundo procesamiento proteolítico que da lugar a la forma madura de la proteína denominada VP2. La superficie externa de los viriones está formada por subunidades triméricas constituidas por una relación variable de VPX y VP2 (Chevalier, C., J. Lepault, I. Erk, B. Da Costa, and B. Delmas 2002. The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. J Virol. 76: 2384-92; Lombardo, E., A. Maraver, J. R. Cast n, J. Rivera, A. Fernandez-Arias, A. Serrano, J. L. Carrascosa, and J. F. Rodriguez 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. J Virol. 73: 6973-83). Se ha sugerido que la conversión de VPX a VP2 está asociada a la formación de cápsidas maduras (Chevalier, C., J. Lepault, I. Erk, B. Da Costa, and B. Delmas 2002. The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. J Virol. 76: 2384-92; Martinez-Torrecuadrada, J. L., J. R. Caston, M. Castro, J. L. Carrascosa, J. F. Rodriguez, and J. I. Casal 2000. Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. Virology. 278: 322-31). Los sitios de procesamiento proteolítico de la poliproteína han

sido caracterizados (Da Costa, B., C. Chevalier, C. Henry, J. C. Huet, S. Petit, J. Lepault, H. Boot, and B. Delmas 2002. The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *J Virol.* 76: 2393-402; Sanchez, A. B., and J. F. Rodriguez 1999. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology.* 262: 190-9), lo que permite una expresión fidedigna de los polipéptidos de la cápsida. La ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) viral, denominada VP1, interacciona con la proteína VP3 dando lugar a un complejo que facilita su encapsidación (Lombardo, E., A. Maraver, J. R. Castán, J. Rivera, A. Fernandez-Arias, A. Serrano, J. L. Carrascosa, and J. F. Rodriguez 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J Virol.* 73: 6973-83; Tacken, M. G., P. J. Rottier, A. L. Gielkens, and B. P. Peeters 2000. Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1. *J Gen Virol.* 81 Pt 1: 209-18). El dominio de la proteína VP3 responsable de esta interacción está localizado en su 16 residuos C-terminales (Maraver A, R. Clemente, JF Rodriguez, E Lombardo. Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of the inner capsid protein VP3 of infectious bursal disease virus). La proteína VP3 interacciona con ARN de forma. Esta interacción no requiere la existencia de secuencias específicas en la molécula de ARN (Kochan, G., D. González, and J. F. Rodriguez.. Characterization of the RNA binding activity of VP3, a major structural protein of IBDV. 2003. *Archives of Virology* in press). Parece probable, al igual que lo observado con otras proteínas internas de cápsidas de otros virus, que VP3 estabilice el ARN genómico en la partícula viral.

La producción de cápsidas vacías o VLPs mediante expresión de la poliproteína viral empleando distintos sistemas de expresión ha sido descrita por diferentes laboratorios. La primera descripción de la obtención de VLPs en células de insecto fue realizada por Vakaria en 1997 (Vakharia, V. N. 1997. Development of recombinant vaccines against infectious bursal disease. *Biotechnology Annual Review* 3: 151-68). En 1998 nuestro grupo demostró la posibilidad de obtener VLPs en células de mamífero (Fernandez-Arias A, Risco C, Martinez S, Albar JP, Rodriguez JF. 1998. Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 79: 1047-54). En 1999 se publicó de nuevo un artículo describiendo la obtención de VLPs de IBDV en células de insecto por parte de otro grupo de investigación (Kibenge FS, Qian B, Nagy E, Cleghorn JR, Wadowska D.

1999. Formation of virus-like particles when the polyprotein gene (segment A) of infectious bursal disease virus is expressed in insect cells. *Can J Vet Res* 63: 49-55).

Un estudio posterior, publicado por nuestro laboratorio en colaboración con INGENASA S.A., demostró que la morfogénesis de VLPs en células de insecto

5 infectadas con baculovirus recombinantes que expresan la poliproteína de IBDV es muy ineficiente y conduce a la acumulación mayoritaria de estructuras tubulares aberrantes (Martínez-Torrecuadrada, J. L., J. R. Castón, M. Castro, J. L. Carrascosa, J. F. Rodríguez, and J. I. Casal. 2000. Different architectures in the assembly of

infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* 278:

10 322-331). Estos resultados fueron posteriormente corroborados por otro grupo de investigación (Chevalier, C., J. Lepault, I. Erk, B. Da Costa, and B. Delmas. 2002. The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *J. Virol.* 76: 2384-92). En el mismo artículo, este grupo demostró la posibilidad de obtener una morfogénesis eficiente mediante la expresión de una poliproteína

15 quimérica formada por la fusión de la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína verde fluorescente (GFP) al extremo 3' de la fase de lectura abierta de la poliproteína de IBDV. La expresión de esta poliproteína quimérica conduce a la formación de VLPs recombinantes de IBDV que contienen en su interior una proteína de fusión VP3-GFP recombinante, diferente a la presente en los viriones de IBDV. Por

20 otra parte, los resultados descritos en este último trabajo no aportan información acerca del mecanismo(s) responsable de la ineficacia del proceso morfogenético de las VLPs de IBDV en células de insecto.

Es importante resaltar que todas las VLPs descritas con anterioridad carecen de la proteína VP1 que se encuentra presente en los viriones de IBDV. La única descripción de obtención de "VLPs completas" que contienen VP1 fue realizada por nuestro laboratorio (Lombardo, E., A. Maraver, J. R. Castón, J. Rivera, A. Fernández-Arias, A. Serrano, J. L. Carrascosa, and J. F. Rodríguez. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J. Virol.* 73: 6973-83) empleando como vector el virus vacunal lo que impide la posible utilización de estas VLPs con fines vacunales.

Los diversos procedimientos de producción de VLPs de IBDV descritos anteriormente adolecen de diferentes defectos que reducen o impiden su aplicabilidad para la generación de vacunas frente al virus de la bursitis infecciosa:

- 35 i) la producción de VLPs en células de mamífero se basa en el empleo de recombinantes del virus vacunal. Este sistema de producción tiene un

costo muy elevado y, al emplear un virus recombinante capaz de infectar tanto mamíferos como aves, no reúne las condiciones de bioseguridad necesarias para su empleo como vacuna,

ii) La producción de VLPs en células de insecto empleando sistemas de expresión convencionales, es decir baculovirus recombinantes que expresan únicamente la poliproteína viral, es muy ineficiente conduciendo a una producción de VLPs prácticamente nula,

iii) La producción de VLPs en células de insecto mediante la expresión de una poliproteína quimérica tiene como resultado la producción de VLPs que contienen una proteína de fusión VP3-GFP lo que introduce un elemento proteico no presente en viriones de IBDV, de efecto desconocido y de dudosa aplicabilidad en la cadena de producción de carne de pollo para consumo humano, y

iv) Ninguno de los sistemas descritos con anterioridad para la producción de VLPs de IBDV basados en el empleo de baculovirus recombinantes permite la obtención de "VLPs completas" que contengan todos los antígenos presentes en los viriones de IBDV.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Descripción breve

La invención se enfrenta con el problema de proporcionar vacunas más eficaces y seguras frente al virus de la bursitis infecciosa.

Así, un objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de producción y obtención de VLPs completas de IBDV, en adelante procedimiento de la presente invención, que se realiza en células de insecto mediante la utilización de un baculovirus recombinante dual que permite la expresión simultánea de la poliproteína viral y la proteína VP1 a partir de dos fases de lectura abiertas independientes y controladas por promotores distintos y porque comprende los siguientes pasos:

a) Construcción de un plásmido donador portador de una construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV que contiene las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína y la proteína VP1 de IBDV bajo el control transcripcional de dos promotores distintos de baculovirus,

b) Obtención de un bácmido recombinante, que permite la expresión de forma simultánea durante su ciclo replicativo de la poliproteína y la proteína VP1 de IBDV bajo el control transcripcional de promotores de baculovirus, mediante la transformación de bacterias competentes con el plásmido de

a),

c) Obtención de un baculovirus recombinante, que permite la expresión simultánea de las fases lectura abierta correspondientes a la poliproteína y la proteína VP1 de IBDV bajo el control transcripcional de promotores de baculovirus, mediante la transformación de células de insecto con el

d) Obtención de VLPs completas de IBDV mediante la infección de células de insecto con el baculovirus recombinante de c) y purificación posterior.

Así mismo, otro objeto adicional lo constituye el procedimiento de la presente invención donde la infección de células de insecto de c) es una coinfección con dos baculovirus recombinantes distintos, obtenidos por cualquiera de los diferentes métodos establecidos, y que expresan de forma independiente pero simultánea la poliproteína viral y la proteína VP1, respectivamente. La construcción de estos baculovirus recombinantes que permiten la expresión de forma independiente y simultánea de la poliproteína y VP1 de IBDV se puede realizar por cualquier experto en base al estado de la técnica (Cold Spring Harbor, N.Y.; Leusch MS, Lee SC, Olins PO. 1995. A novel host-vector system for direct selection of recombinant baculoviruses (bacmids) in *Escherichia coli*. *Gene* 160: 191-4; Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol* 67: 4566-79).

Un objeto adicional de la presente invención lo constituye una construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV que comprende, al menos, las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína (VP1, VP2 y VPX) y la proteína VP1 de IBDV, y secuencias promotoras de baculovirus (promotores) distintas que permiten la regulación simultánea de la expresión génica de ambas proteínas; y de forma preferente una construcción genética en la que los promotores distintos de baculovirus son p10 y poliedrina de AcMNPV. Un objeto particular de la presente invención lo constituye la construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV desarrollada en la presente invención y que se corresponde con la SEQ ID NO 1.

Un objeto adicional de la presente invención lo constituye un vector de expresión genética, entre otros, plásmidos y bácmidos que comprenden la construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV y que permiten la obtención, por cualquiera de los diferentes métodos establecidos, de baculovirus recombinantes que coexpresen la poliproteína viral y la proteína VP1; y de forma preferente el plásmido pFBD/poly-VP1 y el bácmido recombinante Bac/pFBD/poly-VP1 de la presente

invención.

Un objeto adicional de la presente invención lo constituye un baculovirus recombinante dual que permite la expresión simultánea de la poliproteína viral y la proteína VP1 de IBDV a partir de dos fases de lectura abiertas independientes y controladas por promotores de baculovirus y que permite la producción y obtención de VLPs de IBDV, y de forma preferente el baculovirus recombinante BV/poly-VP1.

Otro objeto adicional de la presente invención lo constituyen células, entre otras bacterias y células de insecto, que contengan la construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV, y de forma preferente las bacterias DH5-pFBD/poly-VP1 (depositada en la CECT con el número de depósito CECT 5777).

Otro objeto adicional de la presente invención lo constituye el empleo del baculovirus recombinante de la presente invención, o de dos baculovirus recombinantes distintos tal como se describe en el párrafo anterior, para la producción y obtención de VLPs de IBDV. Un objeto particular de la presente invención lo constituye el empleo del baculovirus recombinante BV/poly-VP1 para la producción y obtención de VLPs de IBDV.

Un objeto adicional de la presente invención lo constituye una VLPs de IBDV obtenida según el procedimiento y composiciones (construcción genética de poliproteína-VP1 de IBDV, vectores de expresión y células transformadas) de la presente invención.

Finalmente, un objeto de la presente invención lo constituye el empleo de las VLPs de IBDV descritas en la presente invención en la elaboración de vacunas para la enfermedad aviar denominada bursitis infecciosa.

25 Descripción detallada

La invención se enfrenta con el problema de proporcionar vacunas más eficaces y seguras frente al virus de la bursitis infecciosa.

La solución proporcionada por esta invención se basa en que los resultados descritos en esta patente demuestran que: i) La proteína VP3, sintetizada en células de insecto a partir de la expresión de la poliproteína viral, sufre un procesamiento proteolítico que elimina los últimos 13 residuos aminoacídicos de su extremo carboxi-terminal. ii) La proteína VP3 resultante, denominada VP3T, es incapaz de formar oligómeros lo que produce un bloqueo prácticamente total del proceso morfogénico que induce una producción prácticamente nula de VLPs. y iii) La asociación de la proteína VP3 a la proteína VP1 protege a la primera frente al procesamiento proteolítico.

Estos resultados han permitido diseñar una nueva estrategia para la producción eficiente de "VLPs vacías completas" de IBDV que contienen todos los elementos proteícos, antigénicamente relevantes, presentes en viriones purificados e infectivos de IBDV (es decir, las proteínas VPX, VP2, VP3 y VP1) y que, a diferencia de los métodos descritos anteriormente, presentan una morfogénesis eficaz al tiempo que evita la presencia en éstas de elementos proteícos heterólogos inexistentes en partículas virales purificadas (la producción se realiza en células de insecto). Esta estrategia se basa en la utilización de un baculovirus recombinante dual que expresa simultáneamente la poliproteína viral y la proteína VP1 a partir de dos fases de lectura abiertas independientes controladas por promotores diferentes (ver Fig. 1). En estas condiciones las proteínas VP3 y VP1 forman complejos estables que i) impiden la degradación proteolítica de VP3, asegurando su correcto funcionamiento, y ii) conducen a la incorporación de VP1 en las VLPs.

Así, un objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de producción y obtención de VLPs completas de IBDV, en adelante procedimiento de la presente invención, que se realiza en células de insecto mediante la utilización de un baculovirus recombinante dual que permite la expresión simultánea de la poliproteína viral y la proteína VP1 a partir de dos fases de lectura abiertas independientes y controladas por promotores distintos y porque comprende los siguientes pasos:

- a) Construcción de un plásmido donador portador de una construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV que contiene las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína y la proteína VP1 de IBDV bajo el control transcripcional de dos promotores distintos de baculovirus,
- b) Obtención de un bácmido recombinante, que permite la expresión de forma simultánea durante su ciclo replicativo de la poliproteína y la proteína VP1 de IBDV bajo el control transcripcional de promotores de baculovirus, mediante la transformación de bacterias competentes con el plásmido de a),
- c) Obtención de un baculovirus recombinante, que permite la expresión simultánea de las fases lectura abierta correspondientes a la poliproteína y la proteína VP1 de IBDV bajo el control transcripcional de promotores de baculovirus, mediante la transformación de células de insecto con el bácmido recombinante de b), y
- d) Obtención de VLPs completas de IBDV mediante la infección de células de insecto con el baculovirus recombinante de c) y purificación posterior.

Tal como se utiliza en la presente invención el término "VLPs completas de IBDV" se refiere a cápsidas vacías completas del virus IBDV que contienen todas las proteínas presentes en viriones purificados e infectivos de IBDV: VP1, VPX, VP2 y VP3. El término "IBDV" tal como se utiliza en la presente invención se refiere a las diferentes cepas de IBDV conocidas pertenecientes a los serotipos 1 y 2. (revisión: van den Berg TP, Eterradossi N, Toquin D, Meulemans G. 2000. Rev Sci Tech 2000 19: 509-43).

El término "construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV" tal como se utiliza en la presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos, que comprende, al menos, las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína (VP1, VP2 y VPX) y la proteína VP1 de IBDV, y secuencias promotoras de baculovirus (promotores) distintas que permiten la regulación simultánea de la expresión génica de ambas proteínas. Por otro lado, El término "fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína (VP1, VP2 y VPX) y la proteína VP1 de IBDV" tal como se utiliza en la presente invención comprende, además de las secuencias de nucleótidos de dichas fases descritas en la SEQ ID NO1, otras fases de lectura abiertas análogas codificantes de la poliproteína y proteína VP1 de IBDV. Tal como se utiliza en la presente invención el término "análoga" pretende incluir a cualquier secuencia de ADN que puede ser aislada o construida en base a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO 1, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia. En general, una molécula de ADN análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de nucleótidos identificada como la SEQ ID NO 1. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "sustancialmente homóloga" significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de nucleótidos, de, al menos, un 70%, preferentemente de, al menos un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

Tal como se utiliza en la presente invención el término "bacterias competentes" se refiere a bacterias, que contienen el genoma de un baculovirus, entre otros, AcMNPV, modificado genéticamente y que permite la recombinación con plásmidos donadores.

Un objeto particular de esta invención lo constituye el procedimiento de la presente invención donde:

- los promotores distintos de baculovirus de a) son p10 y poliedrina de AcMNPV,
- 5 - la construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV se corresponde con la SEQ ID NO 1,
- el plásmido de a) y b) es pFBD/poly-VP1,
- las bacterias competentes de b) son DH10Bac,
- el bácmido recombinante de b) y c) es Bac/pFBD/poly-VP1,
- 10 - el baculovirus recombinante de c) y d) es BV/poly-VP1, y
- las células de insecto de c) y d) son células HighFive™.

Así mismo, otro objeto adicional lo constituye el procedimiento de la presente invención donde la infección de células de insecto de c) es una coinfección con dos baculovirus recombinantes distintos, obtenidos por cualquiera de los diferentes
15 métodos establecidos, y que expresan de forma independiente pero simultánea la poliproteína viral y la proteína VP1, respectivamente. La construcción de estos baculovirus recombinantes que permiten la expresión de forma independiente y simultánea de la poliproteína y VP1 de IBDV se puede realizar por cualquier experto en base al estado de la técnica (Cold Spring Harbor, N.Y.; Leusch MS, Lee SC, Olins
20 PO. 1995. A novel host-vector system for direct selection of recombinant baculoviruses (bacmids) in Escherichia coli. Gene 160: 191-4; Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in Escherichia coli. J Virol 67: 4566-79).

25 Un objeto adicional de la presente invención lo constituye una construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV que comprende, al menos, las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína (VP1, VP2 y VPX) y la proteína VP1 de IBDV, y secuencias promotoras de baculovirus (promotores) distintas que permiten la regulación simultánea de la expresión génica de ambas proteínas; y de forma
30 preferente una construcción genética en la que los promotores distintos de baculovirus son p10 y poliedrina de AcMNPV. Un objeto particular de la presente invención lo constituye la construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV desarrollada en la presente invención y que se corresponde con la SEQ ID NO 1.

35 Un objeto adicional de la presente invención lo constituye un vector de expresión genética, entre otros, plásmidos y bácmidos que comprenden la construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV y que permiten la obtención, por

cualquiera de los diferentes metodos establecidos, de baculovirus recombinantes que coexpresen la poliproteína viral y la proteína VP1; y de forma preferente el plásmido pFBD/poly-VP1 y el bácmido recombinante Bac/pFBD/poly-VP1 de la presente invención.

5 En general, dicho vector de expresión comprende, al menos, la construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV de la presente invención y, al menos, un promotor que dirige la transcripción de dicha secuencia de nucleótidos de interés (poliproteína y VP1 de IBDV), al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por
10 ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señal de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc. Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos, bacmidos, cromosomas artificiales de levadura (YACs),
15 cromosomas artificiales de bacteria (BACs), cromosomas artificiales basados en el bacteriófago P1 (PACs), cósmidos, o virus, que pueden contener, además, un origen de replicación bacteriano o de levadura para que pueda ser amplificado en bacterias o levaduras, así como un marcador utilizable para seleccionar las células transfectadas diferente al gen o genes de interés. Estos vectores pueden ser obtenidos por métodos
20 convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory].

Un objeto adicional de la presente invención lo constituye un baculovirus recombinante dual que permite la expresión simultánea de la poliproteína viral y la
25 proteína VP1 de IBDV a partir de dos fases de lectura abiertas independientes y controladas por promotores de baculovirus y que permite la producción y obtención de VLPs de IBDV, y de forma preferente el baculovirus recombinante BV/poly-VP1.

Otro objeto adicional de la presente invención lo constituyen células, entre otras bacterias y células de insecto, que contengan la construcción genética
30 poliproteína-VP1 de IBDV, y de forma preferente las bacterias DH5-pFBD/poly-VP1 (depositada en la CECT con el número de depósito CECT 5777).

Otro objeto adicional de la presente invención lo constituye el empleo del baculovirus recombinante de la presente invención, o de dos baculovirus recombinantes distintos tal como se describe en el párrafo anterior, para la producción
35 y obtención de VLPs de IBDV. Un objeto particular de la presente invención lo constituye el empleo del baculovirus recombinante BV/poly-VP1 para la producción y

obtención de VLPs de IBDV.

Un objeto adicional de la presente invención lo constituye una VLPs de IBDV obtenida según el procedimiento y composiciones (construcción genética de poliproteína-VP1 de IBDV, vectores de expresión y células transformadas) de la presente invención.

Finalmente, un objeto de la presente invención lo constituye el empleo de las VLPs de IBDV descritas en la presente invención en la elaboración de vacunas para la enfermedad aviar denominada bursitis infecciosa.

10 Depósito De Microorganismo

Un cultivo de la bacteria derivada de DH5, portadora de un plásmido que contiene la construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV, DH5-pFBD/poly-VP1, ha sido depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjassot, 46100 Burjassot, Valencia, España, el 8 de marzo de 2003, correspondiéndole el número de depósito CECT 5777.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Efecto de la delección C-terminal de VP3 en la morfogénesis de VLPs. (A) El diagrama representa de forma gráfica los genes derivados de IBDV expresados por los diferentes recombinantes del virus vacunal empleados para comprobar el efecto de la delección del extremo C-terminal de VP3 en la formación de VLPs de IBDV en células de mamífero. VT7/Poly expresa la poliproteína completa. VT7/Poly 907-1012 expresa una forma delecionada de la poliproteína que carece de los 150 residuos C-terminales. VT7/VP3 expresa la proteína VP3 completa. (B) Efecto de la delección del extremo C-terminal de la poliproteína sobre la distribución subcelular de las proteínas VPX y VP2. Imágenes digitales de microscopía confocal obtenidas a partir de células infectadas con los recombinantes VT7/Poly, VT7/Poly 907-1012 y VT7/VP3, respectivamente. Las células fueron fijadas a las 24 horas post-infección e incubadas con suero anti-VPX/2 de conejo y suero anti-VP3 de rata seguido por incubación con inmunoglobulina de cabra anti-IgG de conejo acoplada a Alexa 488 (verde) y con inmunoglobulina de cabra anti-IgG de rata acoplada a Alexa 488 (rojo). Efecto de la delección del extremo C-terminal de la poliproteína sobre el ensamblaje de cápsidas. Extractos de células infectadas con VT7/Poly, VT7/Poly 907-1012, o coinfectadas con VT7/Poly 907-1012 y VT7/VP3 fueron sometidas a fraccionamiento en gradiente de sacarosa. Una alícuota de cada una de las fracciones fue colocada sobre una rejilla de microscopio electrónico, teñida negativamente y visualizada

mediante microscopía electrónica. Las imágenes representan los ensamblados detectados en fracciones equivalentes de los diferentes gradientes.

Figura 2. Análisis comparativo mediante *Western blot* de la proteína VP3 expresada en diferentes sistemas de expresión. Extractos de células infectadas con IBDV, VT7/Poly y FB/Poly, respectivamente, fueron sometidas a electroforésis SDS-PAGE y análisis por *Western blot* empleando suero de conejo anti-VP3, seguido por incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a HPRO. La señal fue detectada mediante ECL. Se indica la posición de las bandas inmunoreactivas y las de los marcadores de peso molecular.

Figura 3. Caracterización de la proteólisis C-terminal de la proteína VP3 expresada en células de insecto. (A) El diagrama representa de forma gráfica el gen his-VP3 que contiene una cola de histidinas fusionado al extremo N-terminal de VP3 expresado por el recombinante de baculovirus FB/his-VP3. Se indica la secuencia correspondiente a la cola de histidinas y el primer residuo aminoacídico correspondiente a VP3 (subrayado). Muestras correspondientes a extractos totales de células HighFiveTM infectadas con FB/his-VP3, o proteína his-VP3 purificada por afinidad fueron sometidas a electroforésis SDS-PAGE y análisis por *Western blot* empleando suero de conejo anti-cola de histinas (B) o anti-VP3 (C) seguido por incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a HPRO. La señal fue detectada mediante ECL. Se indica la posición de las bandas inmunoreactivas y las de los marcadores de peso molecular.

Figura 4. Localización del sitio de corte proteolítico de la proteína VP3 en células de insecto. (A) El diagrama representa de forma gráfica el grupo de proteínas his-VP3 delecionadas empleadas en la determinación de la posición del sitio de corte proteolítico de la proteína VP3 en células de insecto. (B) Análisis mediante *Western blot* de las diferentes proteínas his-VP3 delecionadas expresadas en células HighFiveTM y purificadas por afinidad (IMAC). Extractos de cultivos de células HighFiveTM infectados con cada uno de los baculovirus recombinantes fueron sometidos a purificación en columnas de afinidad HiTrap (amersham pharmacía biotech). Las proteínas purificadas fueron sometidas a electroforésis SDS-PAGE y análisis por *Western blot* empleando suero de conejo anti-VP3, seguido por incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a HPRO. La señal fue detectada mediante ECL. Se indica la posición de las bandas inmunoreactivas y las de los marcadores de peso molecular. Las flechas indican la posición de la proteína completa (F) y la correspondiente a la forma proteolizada (T).

Figura 5. Efecto de la coexpresión de VP1 sobre la proteólisis de his-VP3.

(A) **Detección de complejos VP3/VP1.** Células HighFive™ fueron infectadas con FB/his-VP3 o FB/VP3-VP1. A las 72 h post-infección las células fueron recogidas y los extractos correspondientes sometidos a purificación en columnas de afinidad HiTrap (amersham pharmacia biotech). Muestras correspondientes a extractos totales (T) o proteínas purificadas fueron sometidas a electroforésis SDS-PAGE. Los geles fueron posteriormente teñidos con nitrato de plata. Se indica la posición de los marcadores de peso molecular. (B) Análisis mediante Western blot de extractos de células HighFive™ infectadas con FB/his-VP3, FB/VP3-VP1, o coinfectadas con FB/VP3 y FB/VP1, respectivamente. Las células infectadas fueron recogidas a 72 h post-infección y homogeneizadas. Los extractos correspondientes fueron sometidos a electroforésis SDS-PAGE y análisis por *Western blot* empleando suero de conejo anti-VP3, seguido por incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a HPRO. La señal fue detectada mediante ECL. Se indica la posición de los marcadores de peso molecular.

Figura 6. Localización del dominio de oligomerización. (A) El diagrama representa de forma gráfica el grupo de proteínas his-VP3 delecionadas empleadas en la determinación de la posición del dominio de oligomerización. Las regiones delecionadas se indican con la línea de puntos. El nombre de cada mutante indica la localización de los residuos aminoacídicos eliminados en la secuencia de la proteína VP3. (B) Detección de oligómeros de VP3. Las diferentes proteínas de deleción de his-VP3, purificadas por afinidad en columnas hiTrap (amersham pharmacia biotech), fueron sometidas a electroforésis SDS-PAGE y análisis por *Western blot* empleando suero de conejo anti-VP3, seguido por incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a HPRO. (C) Las muestras descritas en el apartado anterior fueron sometidas a electroforésis no desnaturizante seguida por análisis por *Western blot* empleando suero de conejo anti-VP3, seguido por incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a HPRO. (D) Detección de oligómeros de VP3 producidos por mutantes de deleción C-terminal de VP3. Las proteínas purificadas fueron sometidas a electroforésis SDS-PAGE y análisis por *Western blot* empleando suero de conejo anti-VP3, seguido por incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a HPRO. La señal fue detectada mediante ECL. Se indica la posición de los marcadores de peso molecular.

Figura 8. Determinación del efecto de la coexpresión de VP1 sobre el procesamiento proteolítico de VP3 y la distribución subcelular de las proteínas de la cápsida.

(A) Detección de las proteínas VP1 y VP3 acumuladas en células HighFiveTM infectadas con FB/Poly y FB/Poly-VP1, respectivamente. Células infectadas fueron recogidas a 24, 48 y 72 h post-infección. Las muestras fueron sometidas SDS-PAGE y análisis por *Western blot* empleando suero de conejo anti-VP3 o anti-VP1, seguido por incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a HPRO. Se indica la posición de los marcadores de peso molecular. (D) La distribución subcelular de las proteínas VPX/2 y VP3 en células infectadas con FB/Poly y FBD/Poly-VP1 fue analizada microscopía confocal. Las células fueron fijadas a las 60 h post-infección, y a continuación incubadas con suero de conejo anti-VPX y suero de rata anti-VP3 seguido por incubación con inmunoglobulina de cabra anti-IgG de conejo acoplada a Alexa 488 (verde) y con inmunoglobulina de cabra anti-IgG de rata acoplada a Alexa 488 (rojo). Las flechas indican la posición de los aviroplasmas formados por VPX/2 y VP3.

Figura 9. Caracterización de las estructuras formadas por expresión de las poliproteína en células infectadas con FB/Poly-VP1. (A) Células HighFiveTM fueron infectadas con FB/Poly o FBD/Poly-VP1. A las 90 h post-infección las células fueron recogidas y los extractos correspondientes empleados por la purificación de estructuras mediante gradientes de sacarosa. Después de la centrifugación se recogieron 6 alícuotas de 2 ml. Una parte de cada alícuota fue colocada sobre una rejilla, teñida negativamente con acetato de uranilo, y analizada mediante observación al microscopio electrónico. Las fracciones #1 corresponden al fondo de los gradientes. No se muestran las fracciones #6, que contenían proteína soluble y estructuras desensambladas. La barra corresponde a 200 nm. (B) VLPs purificadas a partir de células infectadas con FBD/Poly. La imagen corresponde a la fracción #5 del gradiente obtenido a partir de células infectadas con FBD/Poly-VP1. Los recuadros ampliados muestran dos VLPs a una amplificación mayor. (C) Caracterización de los polipéptidos presentes en la fracción #5 de ambos gradientes. Una alícuota de la fracción #5 de cada gradiente fue sometida a SDS-PAGE y análisis por *Western blot* empleando suero de conejo anti-VP3 o anti-VP1, seguido por incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a HPRO. Se indica la posición de VPX, VP2, VP3 completa (F) y VP3 proteolizada (T).

EJEMPLO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

Ejemplo 1. - La delección del extremo C-terminal de la proteína VP3 elimina la formación de VLPs de IBDV. Se ha descrito recientemente por los inventores de la

presente invención (Maraver A, R. Clemente, JF Rodriguez, E Lombardo. Identification

and molecular characterization of the RNA polymeras-binding motif of the inner capsid protein VP3 of infectious bursal disease virus) que el extremo C-terminal de VP3

contiene el dominio responsable de la interacción de esta proteína con la proteína VP1. Por ello, decidimos analizar el posible papel de la región C-terminal de VP3 en la morfogénesis de las VLPs. Como punto de partida para este análisis empleamos un

virus vacunal recombinante denominado VT7/Poly 907-1012 que expresa una forma delecionada de VP3 que carece de los 105 residuos C-terminales (Sanchez, A. B.

2000) (Fig. 1A). El análisis mediante SDS-PAGE y Western blot mostró que la delección no afecta al procesamiento proteolítico co-traducciona de la poliproteína (Sanchez, A.

B. 2000). La expresión de Poly 907-1012 da lugar a la formación de estructuras tubulares similares a los túbulos de tipo I formados en células infectadas con IBDV

(Kaufer, I., and E. Weiss 1976. Electron-microscope studies on the pathogenesis of infectious bursal disease after intrabursal application of the causal virus. Avian Dis. 20:483-95). Las estructuras tubulares formadas por expresión de Poly 907-1012 se

detectaron mediante inmunofluorescencia empleando anticuerpos anti-VPX/2 y anti-VP3 (Fig. 1B), y mediante microscopía electrónica de fracciones obtenidas mediante

purificación en gradientes de sacarosa (Fig. 1C). El análisis mediante Western blot confirmó la presencia de VPX y VP3 en los citados túbulos. Con el fin de confirmar que

el fenotipo mencionado era debido a la delección dentro de la región correspondiente a VP3, se realizó un experimento co-infectando células BSC-1 con VT7/Poly 907-1012 y

VT7/VP3. VT7/VP3 es un recombinante de virus vacunal que expresa la proteína VP3 completa (Fernandez-Arias, A., S. Martinez, and J. F. Rodriguez 1997. The major

antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer. J Virol. 71: 8014-8). Un análisis realizado mediante microscopía confocal demostró que

la co-expresión de la proteína VP3 completa produce una reducción significativa en la formación de túbulos de tipo I. En las célulasco infectadas la distribución subcelular de

las proteínas VPX/VP3 se caracteriza por la formación de túbulos cortos y viroplasmas similares a los detectados en células infectadas con la poliproteína completa (Fig. 1B).

Esta observación indicó que la co-expresión de la proteína VP3 completa rescata parcialmente la capacidad de Poly 907-1012 de formar VLPs. El análisis mediante

microscopía electrónica de fracciones derivadas de la co-infección confirmó esta hipótesis. Así, las fracciones superiores del gradiente estaban muy enriquecidas en

túbulos cortos y ensamblados quasi-esféricos, denominados capsoides, con un diámetro de 60-70 nm, junto con una pequeña proporción de VLPs de contorno poligonal (Fig. 1C). El análisis mediante Western blot de las fracciones superiores del gradiente, que contenían la mayor concentración de capsoides, mostró contener una mayor proporción de proteína VP3 completa que de VP3 907-1012 (datos no mostrados). Este resultado indicó que la incorporación de la proteína VP3 completa en estas estructuras es más eficiente que la de la forma deletada. Estos resultados demuestran que el extremo C-terminal de VP3 juega un papel fundamental en la morfogénesis de la cápsida de IBDV.

La proteína VP3 sufre un procesamiento proteolítico en células de insecto. Se ha descrito anteriormente que la expresión de la poliproteína de IBDV en células de insecto produce el ensamblado de túbulos largos formados por hexámeros de trímeros de VPX (Da Costa, B., C. Chevalier, C. Henry, J. C. Huet, S. Petit, J. Lepault, H. Boot, and B. Delmas 2002. The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *J Virol.* 76: 2393-402; Martínez-Torrecuadrada, J. L., J. R. Caston, M. Castro, J. L. Carrascosa, J. F. Rodríguez, and J. I. Casal 2000. Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology.* 278: 322-31). La similitud entre los túbulos observados en células de mamífero infectadas con VT7/Poly 907-1012 y los detectados en células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes que expresan la poliproteína completa nos llevó a analizar el estado de la proteína VP3 acumulada en células de insecto. Para ello, extractos de células infectadas con IBDV, VT7/Poly y FB/Poly, respectivamente, fueron analizados mediante Western blot usando suero anti-VP3 (Fernández-Arias, A., S. Martínez, and J. F. Rodríguez 1997. The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer. *J Virol.* 71: 8014-8). En células infectadas con IBDV y VT7/Poly, se detectó la presencia de una única banda de 29 kDa, el tamaño esperado de la proteína VP3 completa (Fig. 2). Por el contrario, en células de insecto infectadas con FB/Poly se detectó la presencia de dos bandas correspondientes a polipéptidos de 29 y 27 kDa, respectivamente (Fig. 2). Un análisis de expresión temporal demostró que aunque la aparición del producto de 27 kDa está ligeramente retrasada con respecto a la aparición del producto de 29 kDa, pasa a ser predominante durante la fase tardía de la infección (Fig. 8A). Un análisis similar realizado en células Sf9 produjo idénticos resultados (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que en células de insecto la proteína VP3 sufre una modificación post-traducciona que da lugar a la acumulación de un producto de 27 kDa.

La infección de células de insecto con un baculovirus recombinante, FB/his-VP3, que expresa una versión de VP3 que contiene una cola de seis residuos de histidina (6xhis), denominada his-VP3 (Fig. 3A), da lugar a la acumulación de dos formas moleculares de la proteína, 32 y 30 kDa, respectivamente, similares a las observadas en células infectadas con FB/Poly (Kochan, G., D. González. and J. F. Rodríguez. Characterization of the RNA binding activity of VP3, a major structural protein of IBDV. 2003. Archives of Virology in press). Por ello, empleamos FB/his-VP3 como herramienta para determinar el origen de la proteína VP3 de menor tamaño. Para ello, tanto extractos totales de células infectadas con FB/his-VP3 como proteína purificada mediante IMAC fueron analizados mediante SDS-PAGE y Western blot empleando suero anti-VP3 (Fig 3B) y anti-6xhis (Fig 3C). Como se muestra en la Fig. 3B, el polipéptido de 30 kDa se encuentra presente en la muestra de proteína purificada lo que demuestra que su extremo N-terminal permanece intacto. Por otra parte, tanto el producto de 32 kDa como el de 30 kDa son reconocidos por ambos antisueros (Fig. 3B y C). Estos resultados indican muy fuertemente que en células de insecto la proteína VP3 sufre una proteólisis que da lugar a la acumulación de un producto que carece de un fragmento de 2 kDa en su extremo C-terminal. Con el fin de determinar firmemente esta posibilidad se emplearon seis baculovirus recombinantes denominados his-VP3 253-257, -VP3 248-257, -VP3 243-257, -VP3 238-257, -VP3 233-257, y -VP3 228-257, respectivamente. Estos recombinantes expresan una serie de formas de delección de VP3 que contienen una cola de histidinas. Las delecciones fueron generadas para eliminar de forma escalonada grupos de 5 residuos aminoacídicos y, así, generar una colección con delecciones crecientes en el extremo C-terminal de la proteína como se muestra en la Fig. 4A. La expresión de estas proteínas fue analizada mediante Western blot empleando suero anti-VP3. Como se muestra en la Fig. 4B, la expresión de la proteína completa his-VP3 y de la proteína mutante his-VP3 253-257 dio lugar a la formación de dobletes. Por otro lado, las proteínas que contenían delecciones de 10 ó más residuos migraron de acuerdo a su tamaño esperado dando lugar a una sola banda (Fig. 4B). Este resultado demuestra que el extremo C-terminal de la proteína VP3 es procesado proteolíticamente y que la delección del sitio de corte evita la proteólisis. La movilidad electroforética de la proteína his-VP3 248-257 es ligeramente inferior a la de los polipéptidos generados por procesamiento proteolítico de his-VP3 e his-VP3 253-257, lo que indica que el procesamiento tiene lugar en la región localizada entre los residuos 243 y 248. Probablemente, el extremo C-terminal de la proteína his-VP3 248-257 es demasiado corto para permitir el reconocimiento por parte de la

proteasa, y por ello no sufriría el procesamiento proteolítico.

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos con los mutantes de delección de his-VP3 y establecer de una forma precisa la posición de sitio de corte proteolítico en la proteína VP3, extractos de células HighFive™ infectadas con FB/his-VP3 fueron sometidos a purificación IMAC. La proteína purificada resultante fue analizada mediante espectrometría de masas. El experimento fue repetido tres veces empleando purificaciones independientes. Los resultados obtenidos fueron similares en todos los casos (una diferencia en masa inferior al 0,03%). La Fig. 5A muestra los resultados de uno de estos experimentos. Se determinó la presencia de dos polipéptidos de 32.004 y 30.444 Da, respectivamente. Estos resultados muestran que el procesamiento proteolítico produce la eliminación de un péptido de 1.560 Da del extremo C-terminal de his-VP3. Este tamaño encaja con la masa molecular (1.576) correspondiente a los 13 residuos C-terminales de VP3 (245GRWIRTVSDLEDLE257) (SEQ ID NO3).

El conjunto de estos resultados demuestra que la proteína VP3 es procesada proteolíticamente en células de insecto entre los residuos L244 y G245, dando lugar a un polipéptido que carece de los 13 residuos C-terminales.

Ejemplo 2.- Generación de un baculovirus recombinante que co-expresa las fases de lectura abierta A1 y B1 del genoma de IBDV.

1. Construcción del plásmido pFBD/VP1. La secuencia nucleotídica correspondiente a la fase de lectura abierta B1 del genoma de IBDV se obtuvo a partir del plásmido pBSKVP1 descrito anteriormente (Lombardo, E., A. Maraver, J. R. Castón, J. Rivera, A. Fernández-Arias, A. Serrano, J. L. Carrascosa, and J. F. Rodríguez. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J. Virol.* 73: 6973-83). El plásmido fue purificado y sometido a los siguientes tratamientos enzimáticos: i) digestión con el enzima de restricción *Not* I; ii) incubación con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli* en presencia de dNTPs; iii) digestión con el enzima de restricción *Xho* I. A continuación, el fragmento de DNA correspondiente fue purificado y utilizado para su clonaje en el vector pFastBacDual (Invitrogen) previamente tratado con los enzimas de restricción *Xho* I y *Pvu* II. Para ello, el fragmento de DNA y el plásmido linerizado fueron incubados en presencia de T4 DNA ligasa.

2. Construcción del plásmido pFBD/Poly-VP1. La secuencia nucleotídica correspondiente a la fase de lectura abierta A1 del genoma de IBDV se obtuvo a partir del plásmido pCIneoPoly descrito anteriormente (Lombardo, E., A. Maraver, J. R. Castón, J. Rivera, A. Fernández-Arias, A. Serrano, J. L. Carrascosa, and J. F.

Rodríguez. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. J. Virol. 73: 6973-83). El plásmido fue purificado e incubado con los enzimas de restricción *Eco* RI y *Not* I. El fragmento de DNA correspondiente fue purificado e incubado con el plásmido pFBD/VP1, previamente digerido con los enzimas de restricción *Eco* RI y *Not* I, en presencia de T4 DNA ligasa. La bacteria transformada con el plásmido resultante pFBD/Poly-VP1 ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número CECT 5777.

3. Obtención del bácmido Bac/pFBD/Poly-VP1. Se realizó mediante transformación de bacterias competentes DH10Bac (Invitrogen), selección de colonias positivas en medio selectivo, y purificación siguiendo la metodología descrita por Invitrogen (números de catálogo 10359016 y 10608016).

4. Obtención del baculovirus recombinante BV/Poly-VP1. El virus fue obtenido mediante transfección de células HighFive™ (Invitrogen™) con el bácmido Bac/pFBD/Poly-VP1 previamente purificado siguiendo la metodología descrita por Invitrogen (números de catálogo 10359016 y 10608016).

Ejemplo 3.- Obtención de VLPs "completas" de IBDV a partir de células HighFive™ infectadas con el baculovirus recombinante BV/Poly-VP1.

Cultivos de células HighFive™ fueron infectadas con el virus recombinante BV/Poly-VP1 empleando una multiplicidad de infección de 5 unidades formadoras de placas por célula. Los cultivos fueron recogidos a las 72 horas post-infección. Las células fueron sedimentadas mediante centrifugación (1500 x g durante 10 min). El sedimento celular fue resuspendido en tampón PES (25 mM PIPES pH 6.2, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl₂). A continuación las células fueron homogeneizadas mediante tres ciclos consecutivos de congelación-descongelación (-70/+37°C). El correspondiente homogenado fue centrifugado (10000 x g durante 15 min a 4°C). El sobrenadante resultante fue recogido y utilizado para la purificación de las VLPs. Para ello, se preparó tubo de centrifuga con un colchón de sacarosa al 25% (peso/volumen), diluida en tampón PES, de 4 ml sobre el que se depositaron 8 ml de sobrenadante. El tubo fue centrifugado (125000 x g durante 3 h a 4°C). El sedimento resultante se resuspendió en 1 ml de tampón PES. A continuación se preparó, en un tubo de centrifuga, un gradiente continuo de 25-50% de sacarosa en tampón PES. Sobre éste deposito el sedimento resuspendido. El tubo fue centrifugado (125000 x g durante 1 h a 4°C). A continuación el gradiente fue fraccionado en alícuotas de 1 ml.

Las diferentes alícuotas fueron analizadas mediante microscopía de

transmisión. Para ello se depositó un volumen de 5 µl de cada muestra sobre una rejilla de microscopio. Las muestras fueron teñidas negativamente con una solución acuosa de acetato de uranilo al 2%. Se empleo un microscopio JEOL 1200 EXII operando a 100 kV y a una magnificación nominal de X 40,000. Este análisis demostró la presencia de VLPs estructuralmente idénticas al viriones de IBDV en las muestras analizadas.

Con el fin de determinar la composición proteica de las VLPs detectadas mediante microscopía electrónica, las muestras fueron analizadas mediante Western blot. Para ello las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida. Los geles fueron posteriormente transferidos a nitrocelulosa e incubados con anticuerpos anti-VPX/2, anti-VP3 y anti-VP1. Los resultados demostraron la presencia de las proteínas VPX, VP2, VP3 y VP1 en las fracciones que contenian VLPs.

15 MATERIALES Y METODOS

Células y virus. Los virus recombinantes VT7/VP3, VT7/Poly 907-1012, FB/Poly, FB/his-VP3 wt, FB/his-VP3 253-257, FB/his-VP3 1-25, FB/his-VP3 26-52, FB/his-VP3 53-77, FB/his-VP3 78-100, FB/his-VP3 101-124, FB/his-VP3 125-150, FB/his-VP3 151-175, FB/his-VP3 176-200, FB/his-VP3 201-224, y FB/his-VP3 216-257 fueron descritos previamente (Fernandez-Arias, A., S. Martinez, and J. F. Rodriguez 1997. The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer. *J Virol.* 71: 8014-8; Kadono-Okuda, K., M. Yamamoto, Y. Higashino, K. Taniai, Y. Kato, S. Chowdhury, J. Xu, S. K. Choi, M. Sugiyama, K. Nakashima, and et al. 1995. Baculovirus-mediated production of the human growth hormone in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem Biophys Res Commun.* 213: 389-96, Kochan, G., D. González. and J. F. Rodriguez. Characterization of the RNA binding activity of VP3, a major structural protein of IBDV. 2003. *Archives of Virology* in press; Martinez-Torrecuadrada, J. L., J. R. Caston, M. Castro, J. L. Carrascosa, J. F. Rodriguez, and J. I. Casal 2000. Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology.* 278: 322-31). Los experimentos de expresión fueron llevados a cabo con células BSC-1 (American Type Culture Collection), HighFive™ (GIBCO™) y Sf9 (GIBCO™). las células BSC-1 fueron cultivadas en medio de Dulbecco modificado por Eagle suplementado con suero fetal bovino al 10%. Las células HighFive™ y Sf9 fueron cultivadas en medio TC-100 suplementado con suero fetal bovino al 10%. Los virus fueron amplificados y titulados siguiendo protocolos previamente descritos (Lombardo, E., A. Maraver, I.

Espinosa, A. Fernandez-Arias, and J. F. Rodriguez 2000. VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology*. 277:345-57; Martinez-Torrecuadrada, J. L., J. R. Caston, M. Castro, J. L. Carrascosa, J. F. Rodriguez, and J. I. Casal 2000. Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology*. 278: 322-31).

Generación de recombinantes de baculovirus. El plásmido previamente descrito pFB/his-VP3 como molde para la generación, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de los fragmentos de ADN empleados en la construcción de los vectores plasmídicos necesarios para la construcción de los recombinantes de baculovirus FB/his-VP3 248-257, FB/his-VP3 243-257, FB/his-VP3 238-257, FB/his-VP3 233-257, y FB/his-VP3 228-257. Las reacciones de PCR fueron realizadas empleando un cebador 5' común y un cebador 3' específico para cada mutante (Ver tabla 1). Tras las reacciones, los fragmentos de ADN correspondientes fueron purificados y digeridos con los enzimas de restricción *Apa* I y *Kpn* I y ligados al plásmido pFB/his-VP3 (21) previamente digerido con los mismos enzimas. De esta manera se generó la serie de plásmidos denominados genéricamente pFB/his-VP3 que contienen delecciones en el extremo 5' de la región codificante de VP3.

Los vectores plasmídicos requeridos para la generación de los recombinantes de baculovirus FB/Poly 1008-1012, FB/Poly 1003-1012, y FB/Poly 998-1012 fue realizada mediante la sustitución del fragmento *Xba* I (343 pares de bases) por sus homólogos, conteniendo las delecciones deseadas, procedentes de los plásmidos FB/his-VP3 253-257, FB/his-VP3 248-257, y FB/his-VP3 243-257, respectivamente.

La construcción del vector plasmídico pFB/VP1 se realizó mediante clonaje de un fragmento de ADN, que contiene la fase de lectura abierta del gen de la proteína VP1 de IBVD, a partir del plásmido pBSKV1 (25) mediante digestión del plásmido con el enzima de restricción *Cla* I seguido por tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y posterior tratamiento con el enzima *Not* I. Este fragmento fue subclonado en el vector pFastBac1 (Invitrogen™) previamente digerido con los enzimas de restricción *Stu* I y *Not* I. El plásmido resultante se denominó pFB/VP1.

Los vectores plasmídicos pFBD/his-VP3-VP1 y pFBD/Poly-VP1 fueron contruidos mediante la inserción de las fases de lectura abierta de los genes de las proteínas VP3 y VP1 en el vector pFastBacDual (Invitrogen™). pFBD/VP1 fue generado mediante inserción de un fragmento que contiene la fase de lectura abierta de VP1 obtenido mediante digestión con el enzima *Not* I, seguido por tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y posterior tratamiento con el enzima *Xho*

I, en el vector pFastBacDual previamente digerido con los enzimas *Xho* I y *Pvu* II. A continuación, el plásmido pFB/his-VP3 (21) fue digerido con los enzimas *Not* I y *Rsr* II, y el fragmento resultante conteniendo la fase de lectura abierta his-VP3 fue insertado en el plásmido pFBD/VP1 previamente digerido con los enzimas *Not* I y *Rsr* II. El plásmido resultante se denominó pFBD/his-VP3-VP1. De forma similar la fase de lectura abierta correspondiente a la poliproteína de IBDV fue aislada a partir del plásmido pCIneoPoly (27) mediante digestión con los enzimas *EcoR* I y *Not* I. El fragmento de ADN correspondiente fue clonado en el plásmido pFBD/VP1 previamente digerido con los enzimas *EcoR* I y *Not* I, dando lugar al vector denominado pFBD/Poly-VP1.

Los baculovirus recombinantes descritos en el trabajo fueron generados usando el sistema Bac-to-Bac siguiendo los protocolos descritos por el fabricante (Invitrogen BV, Groningen, The Netherlands).

Purificación mediante gradientes de sacarosa y caracterización de las estructuras derivadas de la expresión de la poliproteína de IBDV. Células BSC-1 o HighFive™ fueron infectadas con los virus vacunales o baculovirus recombinantes descritos. Las células infectadas fueron recogidas, lisadas y procesadas como se ha descrito anteriormente (25, 28).

Microscopía electrónica. Aliquotas de 5µl, de las diferentes fracciones de los gradientes de sacarosa analizados, se colocaron sobre rejillas de microscopía electrónica. Las muestras así preparadas fueron teñidas negativamente con una solución al 2% de acetato de uranilo. Las micrografías fueron obtenidas con un microscopio Jeol 1200 EXII operando a 100 kV con magnificaciones de 20,000 o 40,000 X.

Purificación de proteínas de fusión his-VP3 y derivados mediante cromatografía de afinidad a metales (IMAC). Células HighFive™ o Sf9 infectadas con los diferentes virus recombinantes descritos fueron recogidas a 72 h post-infección. Después de lavar dos veces en tampón fosfato salino (PBS) las células fueron resuspendidas en tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 8.0 50; 500 mM NaCl) suplementado con inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche) y mantenidas en hielo durante 20 min. A continuación las muestras fueron sometidas a centrifugación a 13,000 x g durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes correspondientes fueron sometidos a purificación IMAC utilizando una resina unida a cobalto (Talon, Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Electroforésis y Western blot. Las muestras de proteína fueron resuspendidas en tampón de Laemmli y sometidas a calentamiento a 100°C durante 5 min. Las

electroforesis fueron realizadas en geles al 11% de poliacrilamida. A continuación las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa mediante *electroblotting*. Antes de la incubación con antisueros específicos las membranas fueron bloqueadas mediante incubación, durante 1 h a temperatura ambiente, con leche en polvo al 5% diluida en PBS.

Inmunofluorescencia (IF), y microscopía confocal (CLSM). Células BSC-1 o HighFiveTM fueron crecidas sobre cubres e infectadas con los recombinantes de virus vacunal o baculovirus. A los tiempos post-infección indicados las células fueron lavadas dos veces con PBS y fijadas con metanol -20°C durante 10 min. Tras la fijación los cubres fueron secados al aire, bloqueados en una solución de suero de ternera recién nacida al 20% en PBS durante 45 min a temperatura ambiente, e incubados con los antisueros indicados. Las muestras fueron visualizadas mediante epifluorescencia empleando un microscopio Zeiss Axiovert 200 equipado con un sistema confocal Bio-Rad Radiance 2100. Las imágenes fueron obtenidas empleando los programas Laser Sharp software package (Bio-Rad).

Análisis mediante espectrometría de masas (MS). Las proteínas fueron pasadas a través de minicolumnas C-18 ZipTip tips (Millipore, Bedford, MA, USA) y eluidas en solución matriz (ácido 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic saturado en solución acuosa de 33% acetonitrilo, y 0.1% de ácido trifluoroacético). Una alícuota de 0.7 µl de la mezcla resultante fue depositada en una sonda MALDI de acero que fue posteriormente secada al aire. Las muestras fueron analizadas empleando un espectrómetro de masas Bruker ReflexTM IV MALDI-TOF (Bruker-Franzen Analytic GmbH, Bremen, Alemania) equipado con una fuente SCOUTTM reflector en modo reflector ión positivo empleando extracción retardada. El voltage de aceleración fue de 20 kV. El equipo fue calibrado externamente empleando señales de masa correspondientes a BSA y dímeros de BSA que cubre el rango de 20-130 m/z.

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento de producción y obtención de VLPs completas de IBDV caracterizado porque se realiza en células de insecto mediante la utilización de un baculovirus recombinante dual que permite la expresión simultánea de la poliproteína viral y la proteína VP1 a partir de dos fases de lectura abiertas independientes y controladas por promotores distintos y porque comprende los siguientes pasos:

- a) Construcción de un plásmido donador portador de una construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV que contiene las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína y la proteína VP1 de IBDV bajo el control transcripcional de dos promotores distintos de baculovirus,
- b) Obtención de un bácmido recombinante, que permite la expresión de forma simultánea durante su ciclo replicativo de la poliproteína y la proteína VP1 de IBDV bajo el control transcripcional de promotores de baculovirus, mediante la transformación de bacterias competentes con el plásmido de a),
- c) Obtención de un baculovirus recombinante, que permite la expresión simultánea de las fases lectura abierta correspondientes a la poliproteína y la proteína VP1 de IBDV bajo el control transcripcional de promotores de baculovirus, mediante transformación de células de insecto con el bácmido recombinante de b), y
- d) Obtención de VLPs completas de IBDV mediante la infección de células de insecto con el baculovirus recombinante de c) y purificación posterior.

2.- Procedimiento de producción y obtención de VLPs completas de IBDV según la reivindicación 1 caracterizado porque:

- los promotores distintos de baculovirus de a) son p10 y poliedrina de AcMNPV,
- el plásmido de a) y b) es pFBD/poly-VP1,
- las bacterias competentes de b) son DH10Bac,
- el bácmido recombinante de b) y c) es Bac/pFBD/poly-VP1,
- el baculovirus recombinante de c) y d) es BV/poly-VP1, y
- las células de insecto de c) y d) son células HighFiveTM.

3.- Procedimiento de producción y obtención de VLPs completas de IBDV según la reivindicación 1 caracterizado porque el baculovirus recombinante dual son dos baculovirus distintos que permiten la expresión independiente y simultánea de la poliproteína viral y la proteína VP1 a partir de dos fases de lectura abiertas independientes y controladas por promotores distintos y porque la infección de células

de insecto de c) es una coinfección con dos baculovirus recombinantes distintos.

4.- Procedimiento de producción y obtención de VLPs completas de IBDV según las reivindicaciones 1 a la 3 caracterizado porque las VLPs completas se refieren a cualquiera de las diferentes cepas de IBDV conocidas pertenecientes a los serotipos 1 y 2.

5.- Construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV caracterizada porque comprende, al menos, las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína (VP1, VP2 y VPX) y la proteína VP1 de IBDV, y secuencias promotoras de baculovirus distintas que permiten la regulación simultánea de la expresión génica de ambas proteínas.

6.- Construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV según la reivindicación 5 caracterizada porque los promotores distintos de baculovirus son p10 y poliedrina de AcMNPV.

7.- Construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV según las reivindicaciones 5 y 6 caracterizada porque está constituida por la SEQ ID NO1.

8.- Vector de expresión genética, entre otros, plásmidos y bácmidos, caracterizado porque comprende la construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a la 7 y porque permite la obtención de baculovirus recombinantes que coexpresen la poliproteína viral y la proteína VP1.

9.- Vector de expresión genética según la reivindicación 8 caracterizado porque pertenece, entre otros, al siguiente grupo: el plásmido pFBD/poly-VP1 y el bácmido recombinante Bac/pFBD/poly-VP1.

10.- Célula, entre otras, bacterias y células de insecto, caracterizada porque contiene la construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a la 7.

11.- Célula según la reivindicación 10 caracterizada porque es la bacteria DH5-pFBD/poly-VP1 (depositada en la CECT con el número de depósito CECT 5777).

12.- Baculovirus recombinante dual que permite la expresión simultánea de la poliproteína viral y la proteína VP1 de IBDV a partir de dos fases de lectura abiertas independientes y controladas por promotores de baculovirus y que permite la producción y obtención de VLPs de IBDV.

13.- Baculovirus recombinante dual según la reivindicación 12 caracterizado porque es el baculovirus recombinante BV/poly-VP1.

14.- Empleo del baculovirus recombinante según las reivindicaciones 12 y 13, o de dos baculovirus recombinantes distintos que permiten la expresión independiente y simultánea de la poliproteína viral y la proteína VP1 a partir de dos fases de lectura abiertas independientes y controladas por promotores distintos, para la producción y

obtención de VLPs de IBDV.

15.- Empleo según la reivindicación 14 caracterizado porque el baculovirus recombinante empleado para la producción y obtención de VLPs de IBDV es el BV/poly-VP1.

- 5 16.- VLPs de IBDV obtenidas mediante el procedimiento según reivindicación 1 a la 4.
- 17.- Empleo de las VLPs de IBDV según la reivindicación 16 en la elaboración de vacunas para la enfermedad aviar denominada bursitis infecciosa.



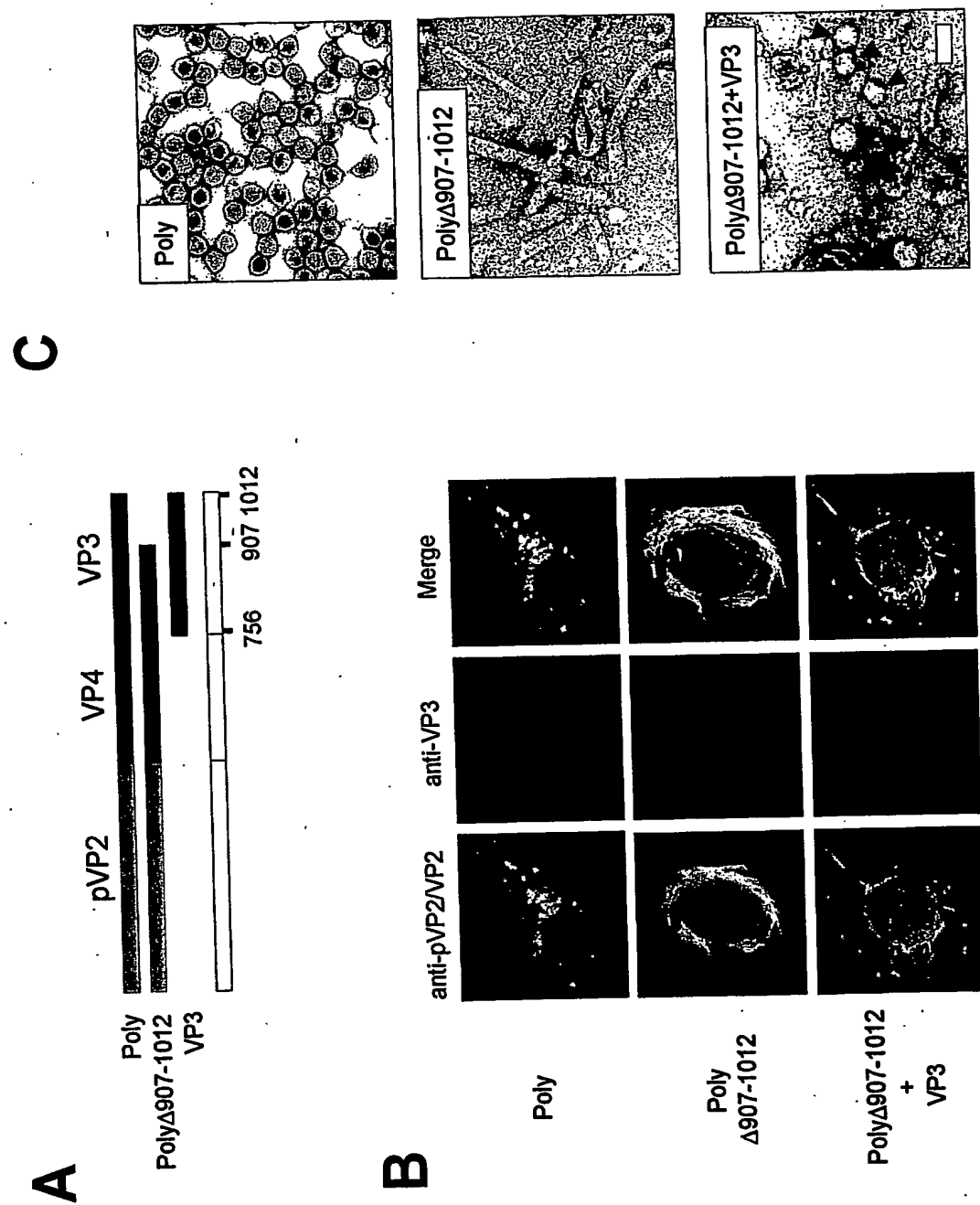


Figura 1

4439 0003 0 10

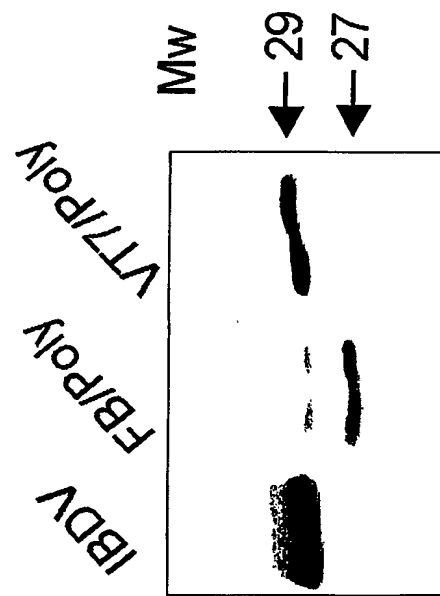


Figura 2

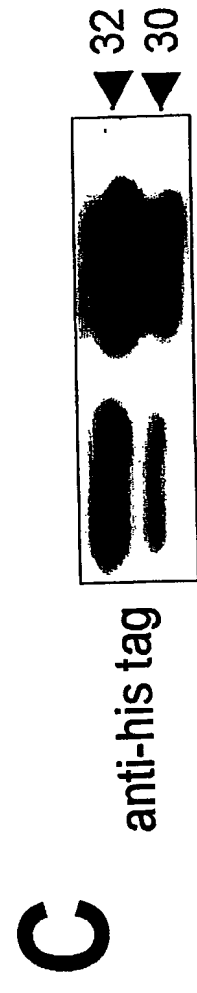
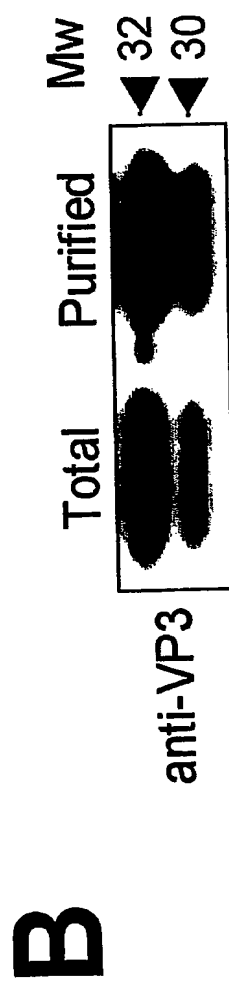
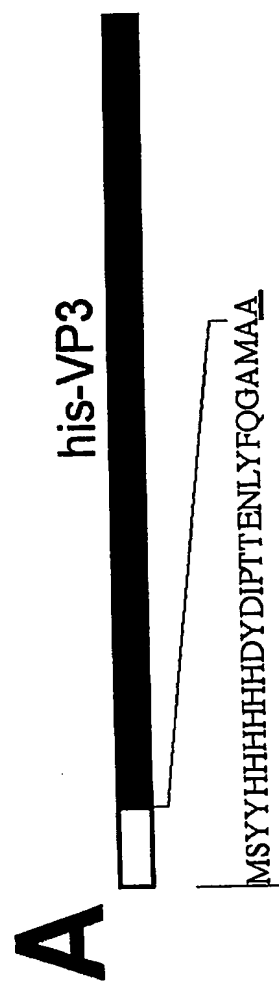
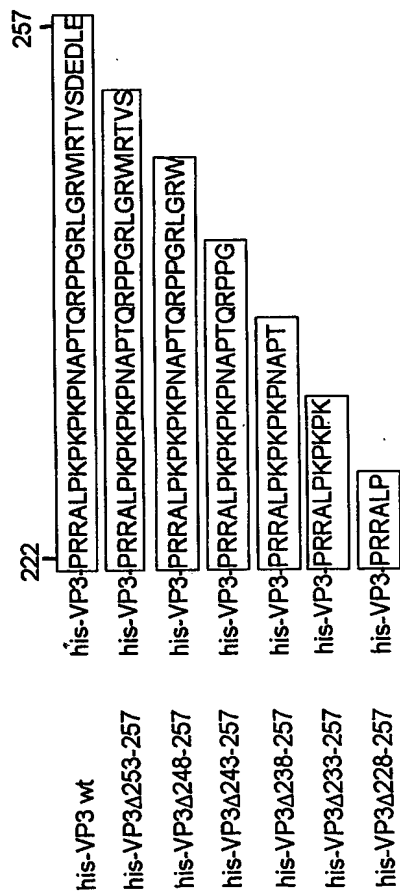


Figura 3

MSYYHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGAMAA

A



B

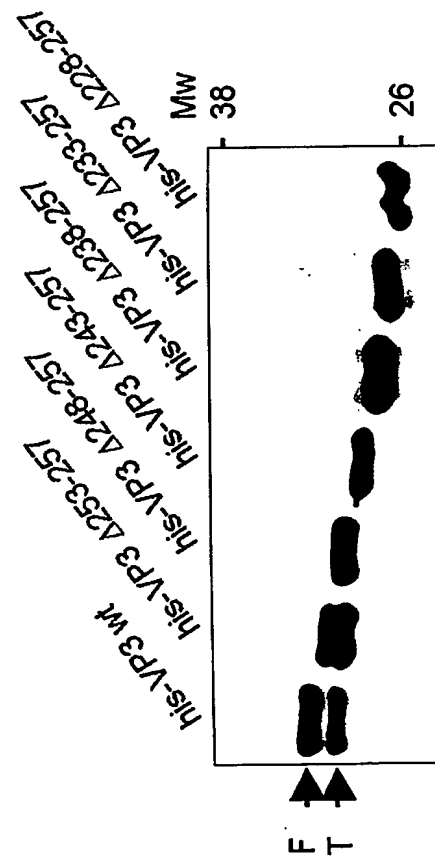


Figura 4

1999 0002 0 13

A

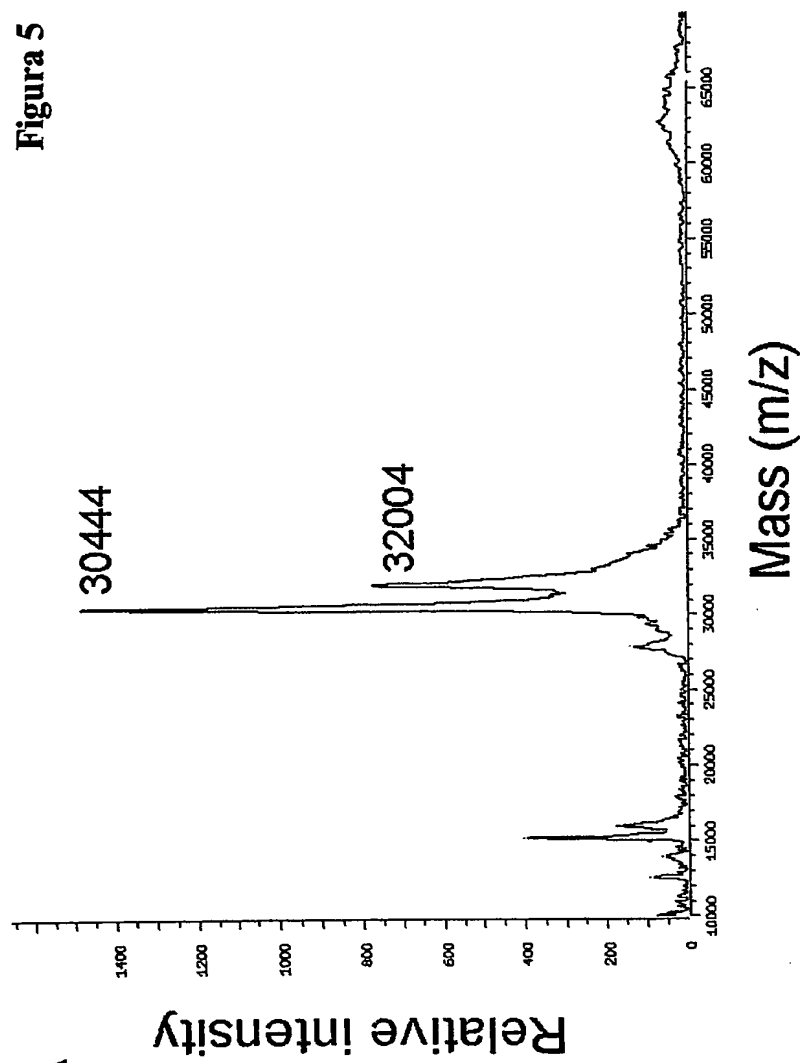


Figura 5

B



his-VP3-PRRALPKPKPNAPTQRPPGRLGRWIRTVSEDELE

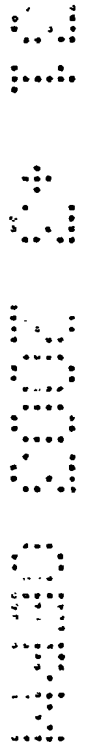


Figura 6

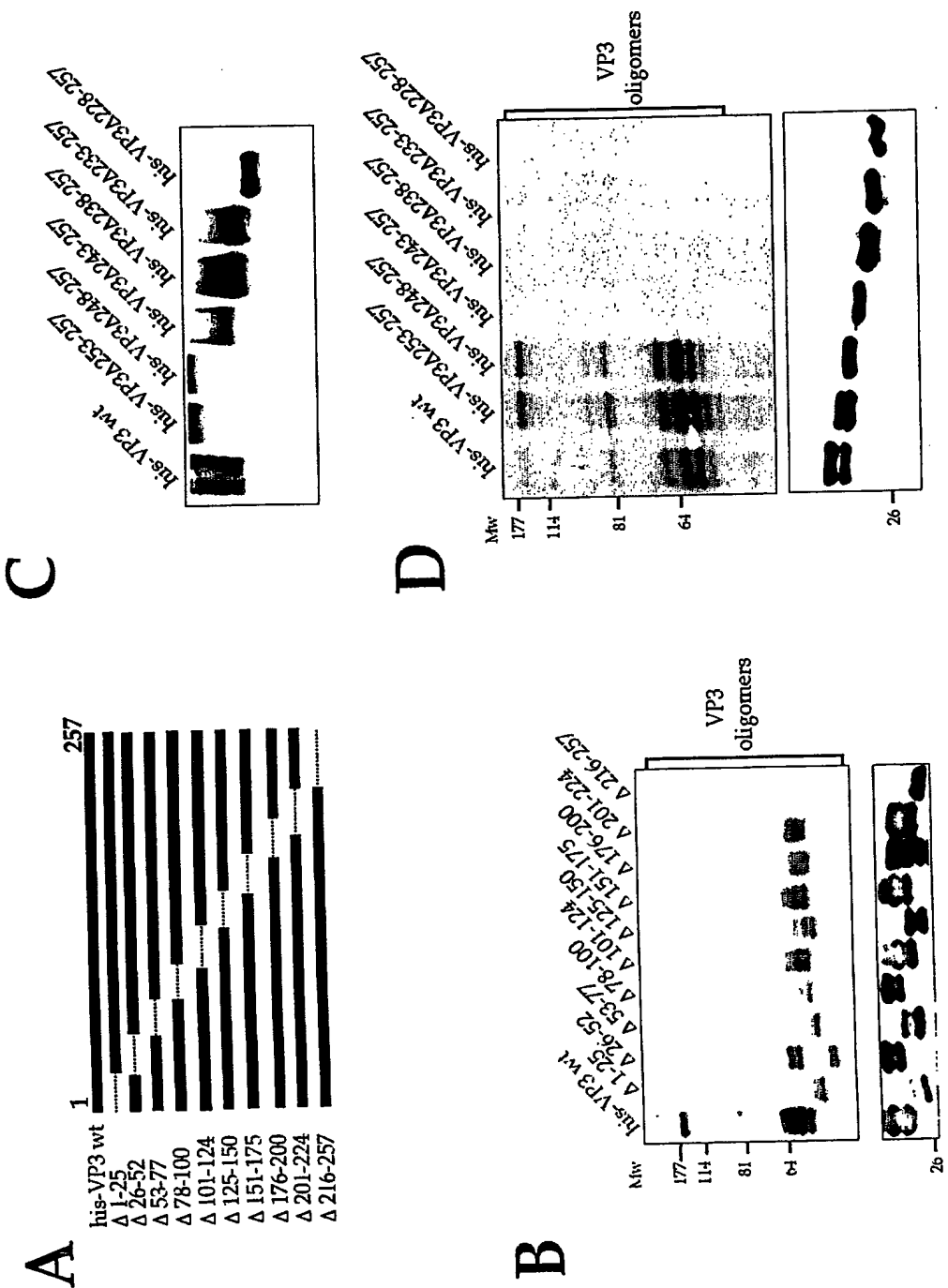
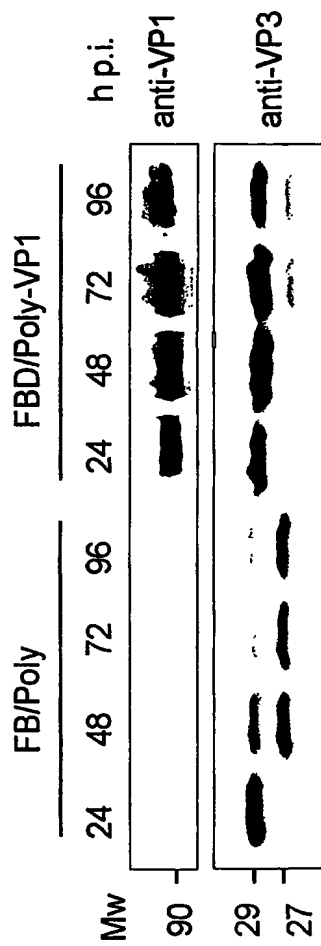


Figura 7

A



B

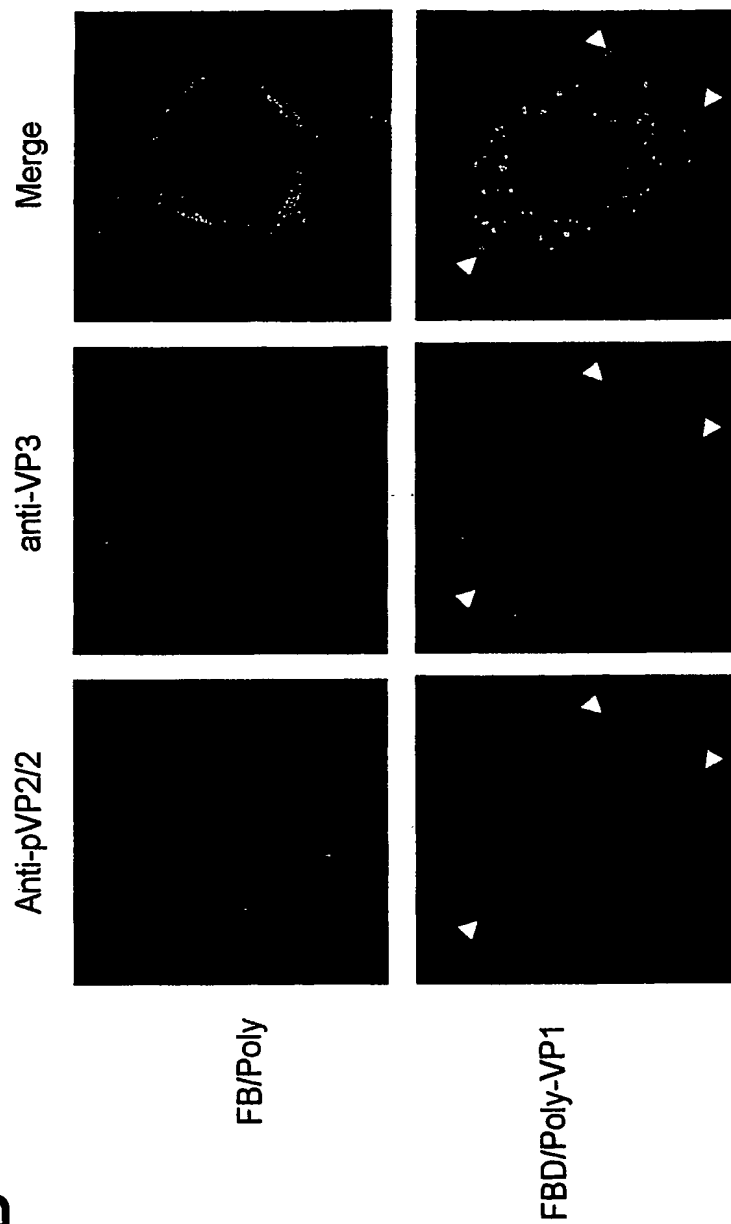
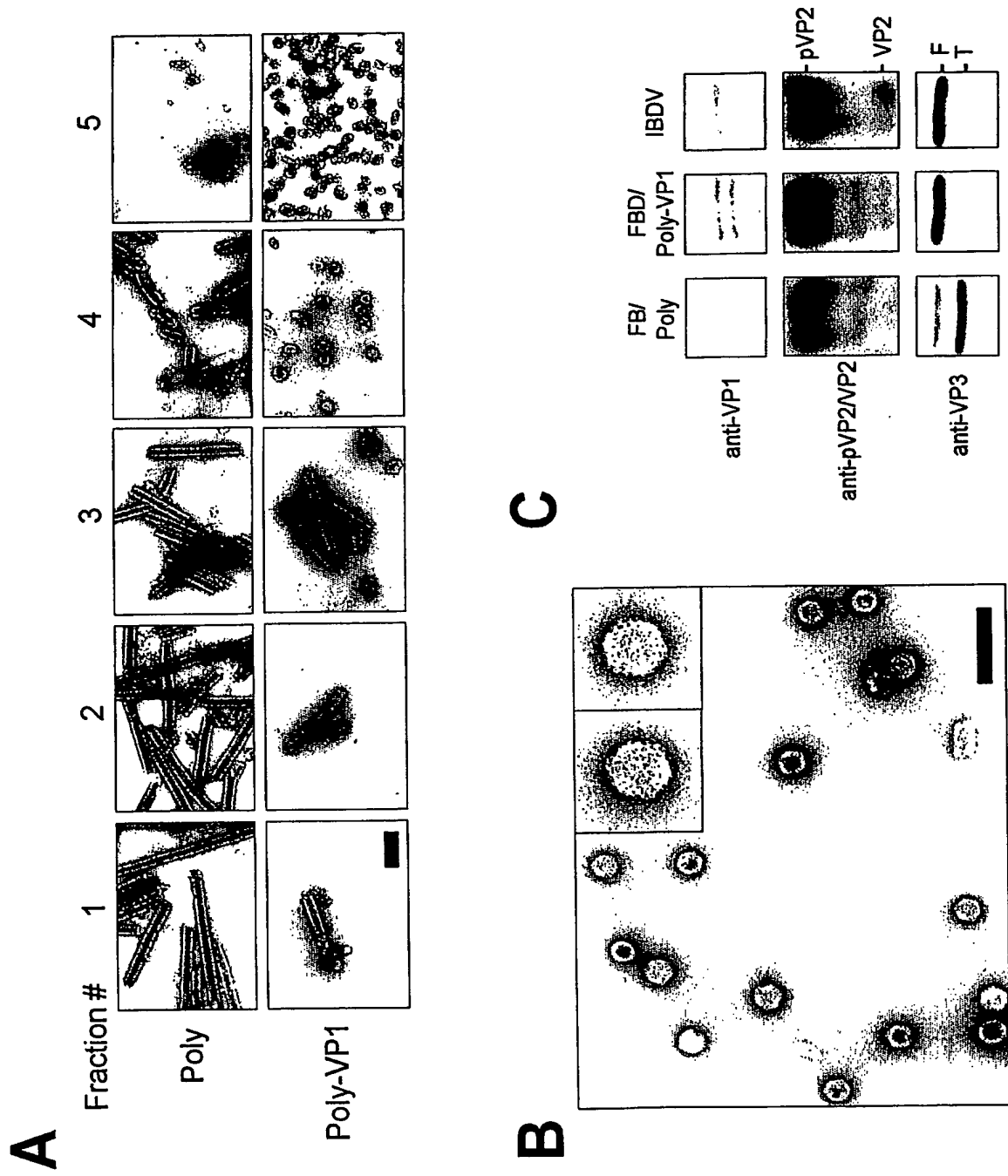


Figura 8

Figure 9



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

5 <120> PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES VACÍAS (VLPS)
DEL VIRUS INDUCTOR DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), COMPOSICIONES
NECESARIAS PARA SU PUESTA A PUNTO Y SU USO EN LA ELABORACIÓN DE VACUNAS
FRENTE AL IBDV

10 <130> VLPS de IBDV

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

15 <210> 1
<211> 10909
<212> DNA

20 <213> Artificial sequence

<220>
25 <223> Construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV

<220>
<221> gene
<222> (3)..(3041)

30 <223> Fase de Lectura Abierta de la Poliproteína de IBDV en cadena
complementaria reversa

<220>
35 <221> promoter
<222> (3083)..(3211)
<223> Promotor de poliedrina de AcMNV

40 <220>
<221> promoter
<222> (3230)..(3351)
<223> Promotor p10 de AcMNV

45 <220>
<221> CDS
<222> (3388)..(6027)

50 <223> Fase de Lectura Abierta de la proteína VP1 de IBDV

<220>
<221> polyA_site
<222> (6068)..(6331)

55 <223>

<220>
<221> gene

<222> (6901)..(7434)
 <223> Gen de resistencia a Gentamicina

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7501)..(7725)
 <223> Minitransposon Tn7R

10 <220>
 <221> gene
 <222> (8787)..(9647)
 <223> Gen de resistencia a Ampicilina

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9854)..(10234)
 20 <223> F1

<220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (10418)..(10583)
 <223> Minitransposon Tn7L

<400> 1
 30 gctcactcaa ggtcctcatc agagacggtc ctgatccagc ggcccagccg accaggggggt 60
 ctctgtgttg gagcattggg ttttggttg ggctttggta gagcccgctt gggattgcga 120
 tgcttcatct ccatcgagc caagagcaga tctttcatct gttcttggtt tgggccacgt 180
 35 ccatgggtga tttcatagac tttggcaact tcgtctatga aagcttgggg tggtctgcc 240
 tgcctggag ccccgtagat cgacgtagct gcccttagga tttgttcttc tgatgccaac 300
 cggctcttct ctgcatgcac gtagtctaga tagtctcgt ttgggtccgg tatttctcgt 360
 40 ttgttctgcc agtactttac ctggcctggg cttggccctc ggtgccatt gagtgcacc 420
 cattctggtg ttgcaaagta gatgcccatt gtctccatct tctttgagat ccgtgtgtct 480
 45 ttttccctct gtgcttcctc tgggtgtggg ccccgagcct ccactccgta gcctgctgtc 540
 ccgtacttgg ccctttgcga cttgctgcct gcttgtggtg cgtttgcaag aaaatttcgc 600
 atccgatggg cgttcgggtc gctgagtgcg aagttggcca tgtcagtcac aatcccatc 660
 50 tcttcagacc acatgaacac actgagtgc gattggaata gtgggtccac gttggctgct 720
 gcttccattg ctctgacggc actctcgagt tcgggggtct ctttgaactc tgatgcagcc 780
 55 atggcaagggt ggtactggcg tcttgcattg ggtggaagggt atggtaggtt gaggtagggg 840
 agcctgtccc agtcgcgtgg attgtgaggg aaacgtttga tgaacgttgc ccagttgggc 900
 ccggtgttta catcgaatgc tccgggacca gccaacctaa ggccaagtcg gtgtgcagta 960
 60

gcgagcttgg tgcttctaaa gcttactttc tcaatctcgc cacaagcatt gagggctccc 1020
 gtcatagcca catggattgg gactttgggt cgaaacacat ccatgtaagc tatggctaga 1080
 5 tttccactgt ttcccacaat aggaggtatg ggatcttttg acagcataat gctgtcgtcc 1140
 cagacatcat ctattgggac aacgggtgtag tctctcccag tctccagtgg aagtacccca 1200
 10 tctggagcat atccatagac tctgtgtcca gagagagttc gtatgaagga tcctctttga 1260
 gatggagggt ggaggtcttc tcgcacgcct tcaatgacag caaacatttt gctgttcaat 1320
 gctttgggtg tcatggcgtc ttccactgtc gtaataacca caggaatag cgtggcacc 1380
 15 tctcttaaca cgcagtcgag gttgtgtgca ccgcggagta cccaggtga agcaagaatc 1440
 ccgtcgacta cgggattctg gggcacctgg aatagattcg cgactacctc gtacccttg 1500
 20 tcggcggcga gagtcagctg ccttatgcgg cctgaggcag ctcttgcttt tcctgacgcg 1560
 gctcgagcag ttctgaagc ggcctgggccc tcatcgccca gcaggtagtc tacaccttc 1620
 ccaattgcat gggctagggg agcggcaggt ggaacaatg tggagaccac cggcacagct 1680
 25 atcctcctta tggcccgat tatgtctttg aagccgaatg ctctgcaat cttcagggga 1740
 gagttgaggt cggccacctc catgaagtat tcacgaaagt cagtgtactc cttgttggc 1800
 30 cagacggtct tgatgccaaag acggtccctc tctactagta tcaattttgt gtagttcatg 1860
 gctcctgggt caaatcggcc gtattctgta accaggttct ttgctagttc aggatttggg 1920
 atcagctcga agttgctcac ccagcgcacc gtaacgacgg atcctgttgc cactctttcg 1980
 35 taggccacta gcgtgacggg acggagggcc cctggatagt tgccaccatg gatcgtcact 2040
 gctaggctcc ctcttgccga ccatgacatc tgatccctg cctgaccacc acttttggag 2100
 40 gtcactatct ccagtttgat ggatgtgatt ggctgggtta tctcgtttgt tggaatcaca 2160
 agattgaatg gcataagggt gtcggtgccg gtcgtcagcc cattgtttgc ggccacagcc 2220
 ctggtgatta ccgttgctcc atcaaagcct atgaggtaga tggtgccgcc cagtacaagg 2280
 45 ccgtggacgc ttgttcgaaa cacgagctct ccccaacgc tgaggcttgt gatggcatca 2340
 atgttggtctg agaacagtgt gattgttacc ccacctggtt ggtactgtga tgagaattgg 2400
 50 taatcatcgg ctgcagttat ggtgtagact ctgggcctgt cactgctgtc acatgtggct 2460
 accatttttg ggtcaagccc tattgcggga atggggtcac caagcctcac ataccaaga 2520
 tcatatgatg tgggtaagct gaggacggtg acccctccc ctactaggac gttcccaatt 2580
 55 ttgtcgttga tggtggctgt tgcagacatc aaccattgt agctaacatc tgtcagttca 2640
 ctcaggcttc cttggaaggt cacggcgttt atggtgccgt ttagtgcata aacgccacca 2700
 60 ggaagtgtgc ttgacctcac tgtgagactc cgactcacta gcctgcagta gttgtaactg 2760

A 4x4 grid of dots forming the number 5. The dots are arranged as follows: Row 1: (1,1), (1,2), (1,3), (1,4); Row 2: (2,1), (2,2), (2,3), (2,4); Row 3: (3,1), (3,2), (3,3), (3,4); Row 4: (4,1), (4,2), (4,3), (4,4).

	ctc ttg acc caa aac ata agg gac aag gcc tat gga agt ggg acc tac	3894	
	Leu Leu Thr Gln Asn Ile Arg Asp Lys Ala Tyr Gly Ser Gly Thr Tyr		
	155 160 165		
5	atg gga caa gca aat cga ctt gtg gcc atg aag gag gtc gcc act gga	3942	
	Met Gly Gln Ala Asn Arg Leu Val Ala Met Lys Glu Val Ala Thr Gly		
	170 175 180 185		
10	aga aac cca aac aag gat cct cta aag ctt ggg tac act ttt gag agc	3990	
	Arg Asn Pro Asn Lys Asp Pro Leu Lys Leu Gly Tyr Thr Phe Glu Ser		
	190 195 200		
15	atc gcg cag cta ctt gac atc aca cta ccg gta ggc cca ccc ggt gag	4038	
	Ile Ala Gln Leu Leu Asp Ile Thr Leu Pro Val Gly Pro Pro Gly Glu		
	205 210 215		
20	gat gac aag ccc tgg gtg cca ctc aca aga gtg ccg tca cgg atg ttg	4086	
	Asp Asp Lys Pro Trp Val Pro Leu Thr Arg Val Pro Ser Arg Met Leu		
	220 225 230		
25	gtg ctg acg gga gac gta gat ggc gac ttt gag gtt gaa gat tac ctt	4134	
	Val Leu Thr Gly Asp Val Asp Gly Asp Phe Glu Val Glu Asp Tyr Leu		
	235 240 245		
30	ccc aaa atc aac ctc aag tca tca agt gga cta cca tat gta ggt cgc	4182	
	Pro Lys Ile Asn Leu Lys Ser Ser Ser Gly Leu Pro Tyr Val Gly Arg		
	250 255 260 265		
35	acc aaa gga gag aca att ggc gag atg ata gct ata tca aac cag ttt	4230	
	Thr Lys Gly Glu Thr Ile Gly Glu Met Ile Ala Ile Ser Asn Gln Phe		
	270 275 280		
40	ctc aga gag cta tca aca ctg ttg aag caa ggt gca ggg aca aag ggg	4278	
	Leu Arg Glu Leu Ser Thr Leu Leu Lys Gln Gly Ala Gly Thr Lys Gly		
	285 290 295		
45	tca aac aag aag aag cta ctc agc atg tta agt gac tat tgg tac tta	4326	
	Ser Asn Lys Lys Lys Leu Leu Ser Met Leu Ser Asp Tyr Trp Tyr Leu		
	300 305 310		
50	tca tgc ggg ctt ttg ttt cca aag gct gaa agg tac gac aaa agt aca	4374	
	Ser Cys Gly Leu Leu Phe Pro Lys Ala Glu Arg Tyr Asp Lys Ser Thr		
	315 320 325		
55	tgg ctc acc aag acc cgg aac ata tgg tca gct cca tcc cca aca cac	4422	
	Trp Leu Thr Lys Thr Arg Asn Ile Trp Ser Ala Pro Ser Pro Thr His		
	330 335 340 345		
60	ctc atg atc tcc atg atc acc tgg ccc gtg atg tcc aac agc cca aat	4470	
	Leu Met Ile Ser Met Ile Thr Trp Pro Val Met Ser Asn Ser Pro Asn		
	350 355 360		
65	aac gtg ttg aac att gaa ggg tgt cca tca ctc tac aaa ttc aac ccg	4518	
	Asn Val Leu Asn Ile Glu Gly Cys Pro Ser Leu Tyr Lys Phe Asn Pro		
	365 370 375		
70	ttc aga gga ggg ttg aac agg atc gtc gag tgg ata ttg gcc ccg gaa	4566	
	Phe Arg Gly Gly Leu Asn Arg Ile Val Glu Trp Ile Leu Ala Pro Glu		
	380 385 390		

		gaa	ccc	aag	gct	ctt	gta	tat	gcg	gac	aac	ata	tac	att	gtc	cac	tca	4614
		Glu	Pro	Lys	Ala	Leu	Val	Tyr	Ala	Asp	Asn	Ile	Tyr	Ile	Val	His	Ser	
		395						400					405					
5		aac	acg	tgg	tac	tca	att	gac	cta	gag	aag	ggg	gag	gca	aac	tgc	act	4662
		Asn	Thr	Trp	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Glu	Lys	Gly	Glu	Ala	Asn	Cys	Thr	
		410					415					420					425	
10		cgc	caa	cac	atg	caa	gcc	gca	atg	tac	tac	ata	ctc	acc	aga	ggg	tgg	4710
		Arg	Gln	His	Met	Gln	Ala	Ala	Met	Tyr	Tyr	Ile	Leu	Thr	Arg	Gly	Trp	
						430					435					440		
15		tca	gac	aac	ggc	gac	cca	atg	ttc	aat	caa	aca	tgg	gcc	acc	ttt	gcc	4758
		Ser	Asp	Asn	Gly	Asp	Pro	Met	Phe	Asn	Gln	Thr	Trp	Ala	Thr	Phe	Ala	
					445					450					455			
20		atg	aac	att	gcc	cct	gct	cta	gtg	gtg	gac	tca	tcg	tgc	ctg	ata	atg	4806
		Met	Asn	Ile	Ala	Pro	Ala	Leu	Val	Val	Asp	Ser	Ser	Cys	Leu	Ile	Met	
					460				465						470			
25		aac	ctg	caa	att	aag	acc	tat	ggg	caa	ggc	agc	ggg	aat	gca	gcc	acg	4854
		Asn	Leu	Gln	Ile	Lys	Thr	Tyr	Gly	Gln	Gly	Ser	Gly	Asn	Ala	Ala	Thr	
			475					480					485					
30		ttc	atc	aac	aac	cac	ctc	ttg	agc	acg	cta	gtg	ctt	gac	cag	tgg	aac	4902
		Phe	Ile	Asn	Asn	His	Leu	Leu	Ser	Thr	Leu	Val	Leu	Asp	Gln	Trp	Asn	
			490				495					500					505	
35		ttg	atg	aga	cag	ccc	aga	cca	gac	agc	gag	gag	ttc	aaa	tca	att	gag	4950
		Leu	Met	Arg	Gln	Pro	Arg	Pro	Asp	Ser	Glu	Glu	Phe	Lys	Ser	Ile	Glu	
						510					515					520		
40		gac	aag	cta	ggg	atc	aac	ttt	aag	att	gag	agg	tcc	att	gat	gat	atc	4998
		Asp	Lys	Leu	Gly	Ile	Asn	Phe	Lys	Ile	Glu	Arg	Ser	Ile	Asp	Asp	Ile	
					525					530					535			
45		agg	ggc	aag	ctg	aga	cag	ctt	gtc	ctc	ctt	gca	caa	cca	ggg	tac	ctg	5046
		Arg	Gly	Lys	Leu	Arg	Gln	Leu	Val	Leu	Leu	Ala	Gln	Pro	Gly	Tyr	Leu	
				540					545					550				
50		agt	ggg	ggg	gtt	gaa	cca	gaa	caa	tcc	agc	cca	act	gtt	gag	ctt	gac	5094
		Ser	Gly	Gly	Val	Glu	Pro	Glu	Gln	Ser	Ser	Pro	Thr	Val	Glu	Leu	Asp	
			555					560					565					
55		cta	cta	ggg	tgg	tca	gct	aca	tac	agc	aaa	gat	ctc	ggg	atc	tat	gtg	5142
		Leu	Leu	Gly	Trp	Ser	Ala	Thr	Tyr	Ser	Lys	Asp	Leu	Gly	Ile	Tyr	Val	
							575					580					585	
60		ccg	gtg	ctt	gac	aag	gaa	cgc	cta	ttt	tgt	tct	gct	gcg	tat	ccc	aag	5190
		Pro	Val	Leu	Asp	Lys	Glu	Arg	Leu	Phe	Cys	Ser	Ala	Ala	Tyr	Pro	Lys	
						590					595					600		
65		gga	gta	gag	aac	aag	agt	ctc	aag	tcc	aaa	gtc	ggg	atc	gag	cag	gca	5238
		Gly	Val	Glu	Asn	Lys	Ser	Leu	Lys	Ser	Lys	Val	Gly	Ile	Glu	Gln	Ala	
					605					610					615			
70		tac	aag	gta	gtc	agg	tat	gag	gcg	tta	agg	ttg	gta	ggg	ggg	tgg	aac	5286
		Tyr	Lys	Val	Val	Arg	Tyr	Glu	Ala	Leu	Arg	Leu	Val	Gly	Gly	Trp	Asn	
				620					625						630			

	tac cca ctc ctg aac aaa gcc tgc aag aat aac gca ggc gcc gct cgg Tyr Pro Leu Leu Asn Lys Ala Cys Lys Asn Asn Ala Gly Ala Ala Arg 635 640 645	5334
5	cgg cat ctg gag gcc aag ggg ttc cca ctc gac gag ttc cta gcc gag Arg His Leu Glu Ala Lys Gly Phe Pro Leu Asp Glu Phe Leu Ala Glu 650 655 660 665	5382
10	tgg tct gag ctg tca gag ttc ggt gag gcc ttc gaa ggc ttc aat atc Trp Ser Glu Leu Ser Glu Phe Gly Glu Ala Phe Glu Gly Phe Asn Ile 670 675 680	5430
15	aag ctg acc gta aca tct gag agc cta gcc gaa ctg aac aag cca gta Lys Leu Thr Val Thr Ser Glu Ser Leu Ala Glu Leu Asn Lys Pro Val 685 690 695	5478
20	ccc ccc aag ccc cca aat gtc aac aga cca gtc aac act ggg gga ctc Pro Pro Lys Pro Pro Asn Val Asn Arg Pro Val Asn Thr Gly Gly Leu 700 705 710	5526
25	aag gca gtc agc aac gcc ctc aag acc ggt cgg tac agg aac gaa gcc Lys Ala Val Ser Asn Ala Leu Lys Thr Gly Arg Tyr Arg Asn Glu Ala 715 720 725	5574
30	gga ctg agt ggt ctc gtc ctt cta gcc aca gca aga agc cgt ctg caa Gly Leu Ser Gly Leu Val Leu Ileu Ala Thr Ala Arg Ser Arg Leu Gln 730 735 740 745	5622
35	gat gca gtt aag gcc aag gca gaa gcc gag aaa ctc cac aag tcc aag Asp Ala Val Lys Ala Lys Ala Glu Ala Glu Lys Leu His Lys Ser Lys 750 755 760	5670
40	cca gac gac ccc gat gca gac tgg ttc gaa aga tca gaa act ctg tca Pro Asp Asp Pro Asp Ala Asp Trp Phe Glu Arg Ser Glu Thr Leu Ser 765 770 775	5718
45	gac ctt ctg gag aaa gcc gac atc gcc agc aag gtc gcc cac tca gca Asp Leu Leu Glu Lys Ala Asp Ile Ala Ser Lys Val Ala His Ser Ala 780 785 790	5766
50	ctc gtg gaa aca agc gac gcc ctt gaa gca gtt cag tcg act tcc gtg Leu Val Glu Thr Ser Asp Ala Leu Glu Ala Val Gln Ser Thr Ser Val 795 800 805	5814
55	tac acc ccc aag tac cca gaa gtc aag aac cca cag acc gcc tcc aac Tyr Thr Pro Lys Tyr Pro Glu Val Lys Asn Pro Gln Thr Ala Ser Asn 810 815 820 825	5862
60	ccg gtt gtt ggg ctc cac ctg ccc gcc aag agg gcc acc ggt gtc cag Pro Val Val Gly Leu His Leu Pro Ala Lys Arg Ala Thr Gly Val Gln 830 835 840	5910
65	gcc gct ctt ctc gga gca gga acg agc aga cca atg ggg atg gag gcc Ala Ala Leu Leu Gly Ala Gly Thr Ser Arg Pro Met Gly Met Glu Ala 845 850 855	5958
70	cca aca cgg tcc aag aac gcc gtg aaa atg gcc aaa cgg cgg caa cgc Pro Thr Arg Ser Lys Asn Ala Val Lys Met Ala Lys Arg Arg Gln Arg 860 865 870	6006

caa aag gag agc cgc caa tag ccatgaggcg gccctgatgc atagcatgcg 6057
 Gln Lys Glu Ser Arg Gln
 875

5 gtaccgggag atgggggagg ctaactgaaa cacggaagga gacaataccg gaaggaaccc 6117
 gcgctatgac ggcaataaaa agacagaata aaacgcacgg gtgttgggtc gtttgttcat 6177
 aaacgcgggg ttcgggtccc gggctggcac tctgtcgata ccccaaggag accccattgg 6237
 10 gaccaatacg cccgcgtttc ttccttttcc ccaccccaac cccaagtgc ggggtgaaggc 6297
 ccagggctcg cagccaacgt cggggcggca agccctgcca tagccactac gggtagctag 6357
 15 gcccaaccact agaactatag ctagagtccg gggcgaacaa acgatgctcg ccttccagaa 6417
 aaccgaggat gcgaaccact tcacccgggg tcagcaccac cggcaagcgc cgcgacggcc 6477
 gaggtctacc gatctcctga agccagggca gatccgtgca cagcaccttg ccgtagaaga 6537
 20 acagcaaggc cgccaatgcc tgacgatgcg tggagaccga aaccttgccg tcgttcgcca 6597
 gccaggacag aaatgcctcg acttcgctgc tgcccaaggt tgccgggtga cgcacaccgt 6657
 25 ggaaacggat gaaggcacga acccagttga cataagcctg ttcgggttcgt aaactgtaat 6717
 gcaagtagcg tatgcgctca cgcaactggg ccagaacctt gaccgaacgc agcgggtggta 6777
 acggcgcagt ggcggttttc atggcttggt atgactgttt ttttgtacag tctatgcctc 6837
 30 gggcatccaa gcagcaagcg cgttacgccg tgggtcgatg tttgatgta tggagcagca 6897
 acgatgttac gcagcagcaa cgatgttacg cagcagggca gtcgccctaa aacaaagtta 6957
 35 ggtggctcaa gtatgggcat cattcgcaca tgtaggctcg gccctgacca agtcaaattc 7017
 atgccccgtg ctcttgatct tttcggtcgt gagttcggag acgtagccac ctactcccaa 7077
 catcagccgg actccgatta cctcgggaac ttgctccgta gtaagacatt catcgcgctt 7137
 40 gctgccttcg accaagaagc ggttggtggc gctctcgcgg cttacgttct gccaggttt 7197
 gagcagccgc gtagtgagat ctatatctat gatctcgcag tctccggcga gcaccggagg 7257
 45 cagggcattg ccaccgcgt catcaatctc ctcaagcatg aggccaacgc gcttggtgct 7317
 tatgtgatct acgtgcaagc agattacggg gacgatcccc cagtggctct ctatacaaag 7377
 ttgggcatac gggaagaagt gatgcacttt gatatcgacc caagtaccgc cacctaacaa 7437
 50 ttcgttcaag ccgagatcgg cttcccgccc gcggagtgtg tcggtaaatt gtcacaacgc 7497
 cgcgaatata gtctttacca tgcccttggc cacgcccctc ttaatacga cgggcaattt 7557
 55 gcaacttcaga aaatgaagag tttgcttttag ccataacaaa agtcagtat gctttttcac 7617
 agcataactg gactgatttc agtttacaac tattctgtct agtttaagac tttattgtca 7677
 tagtttagat ctattttggt cagtttaaga ctttattgtc cgcccacacc cgcttacgca 7737
 60

gggcatccat ttattactca accgtaaccg attttgccag gttacgcggc tggctctgcgg 7797
 tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgctc ttccgcttcc 7857
 5 tgcgtcactg actcgtcgcg ctcggtcggt cggctgcggc gagcgggtatc agctcactca 7917
 aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca 7977
 10 aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt tttccatagg 8037
 ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggtg gcgaaacccg 8097
 acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaaget ccctcgtcg cgctcctggt 8157
 15 ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcggaag cgtggcgctt 8217
 tctcaatgct cacgctgtag gtatctcagt tcgggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc 8277
 tgtgtgcacg aaccccccg tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt 8337
 20 gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg taacaggatt 8397
 agcagagcga ggtatgtagg cgggtgtaca gagttcttga agtgggtggc taactacggc 8457
 25 tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaaaa 8517
 agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg gtagcgggtg tttttttgtt 8577
 tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct 8637
 30 acgggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggatttttgt catgagatta 8697
 tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat gaagttttta atcaatctaa 8757
 35 agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc 8817
 tcagcgatct gtctatttcg ttcattccata gttgcctgac tccccgctcg gtagataact 8877
 acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg agaccacgc 8937
 40 tcaccggctc cagattttatc agcaataaac cagccagccg gaagggccga gcgcagaagt 8997
 ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta 9057
 45 agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg catcgtgggtg 9117
 tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccgggt cccaacgatc aaggcgagtt 9177
 acatgatccc ccatgttggtg caaaaaagcg gttagctcct tcggctcctcc gatcgttgtc 9237
 50 agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atggttatgg cagcactgca taattctctt 9297
 actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggt agtactcaac caagtcattc 9357
 55 tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccg cgtcaatacg ggataatacc 9417
 gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa 9477
 ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcg tgcaccaaac 9537
 60

5 tgatcttcag catctttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa 9597
 aatgccgcaa aaaaggggaat aaggggcgaca cggaatgtt gaatactcat actcttcctt 9657
 10 tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catatttgaa 9717
 tgtatttaga aaaataaaca aatagggggt cgcgcacat tccccgaaa agtgccacct 9777
 gaaattgtaa acgttaatat tttgttaaaa ttcgcgttaa atttttgtta aatcagctca 9837
 ttttttaacc aataggccga aatcggcaaa atcccttata aatcaaaaga atagaccgag 9897
 ataggggtga gtgttggtcc agtttggaac aagagtccac tattaaagaa cgtggactcc 9957
 15 aacgtcaaag ggcgaaaaac cgtctatcag ggcgatggcc cactacgtga accatcacc 10017
 taatcaagtt ttttggggtc gaggtgccgt aaagcactaa atcggaaacc taaagggagc 10077
 ccccgattta gagcttgacg gggaaagccg gcgaacgtgg cgagaaagga agggaagaaa 10137
 20 gcgaaaggag cgggcgctag ggcgctggca agtgtagcgg tcacgctgcg cgtaaccacc 10197
 acaccgccg cgcttaatgc gccgctacag ggcgcgtccc attcgccatt caggctgcaa 10257
 ataagcgttg atattcagtc aattacaaac attaataacg aagagatgac agaaaaattt 10317
 tcattctgtg acagagaaaa agtagccgaa gatgacgggt tgtcacatgg agttggcagg 10377
 atgtttgatt aaaaacataa caggaagaaa aatgccccgc tgtgggcgga caaaatagtt 10437
 30 gggaactggg aggggtggaa atggagtttt taaggattat ttagggaaga gtgacaaaat 10497
 agatgggaac tgggtgtagc gtcgtaagct aatacgaaaa ttaaaaatga caaaatagtt 10557
 tggaactaga tttcacttat ctgggttcgga totcctagc tcaagcagtg atcagatcca 10617
 gacatgataa gatacattga tgagtttgga caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaa 10677
 tgctttatth gtgaaatttg tgatgctatt gctttatttg taaccattat aagctgcaat 10737
 40 aaacaagtta acaacaacaa ttgcattcat tttatgtttc aggttcaggg ggaggtgtgg 10797
 gaggtttttt aaagcaagta aaacctctac aaatgtggta tggctgatta tgatcctcta 10857
 45 gtactttctcg acaagcttgt cgagactgca ggctctagat tcgaaagcgg cc 10909

50 <210> 2
 <211> 879
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

55 <220>
 <223> Proteína VP1 de IBV

60 <400> 2
 Met Ser Asp Val Phe Asn Ser Pro Gln Ala Arg Ser Thr Ile Ser Ala
 1 5 10 15

A 5x5 grid of dots. The dots are arranged in a cross shape, with a vertical column of 5 dots and a horizontal row of 5 dots intersecting at the center dot. There are 9 dots in total.

Ile Trp Ser Ala Pro Ser Pro Thr His Leu Met Ile Ser Met Ile Thr
 340 345 350
 5 Trp Pro Val Met Ser Asn Ser Pro Asn Asn Val Leu Asn Ile Glu Gly
 355 360 365
 Cys Pro Ser Leu Tyr Lys Phe Asn Pro Phe Arg Gly Gly Leu Asn Arg
 370 375 380
 10 Ile Val Glu Trp Ile Leu Ala Pro Glu Glu Pro Lys Ala Leu Val Tyr
 385 390 395 400
 Ala Asp Asn Ile Tyr Ile Val His Ser Asn Thr Trp Tyr Ser Ile Asp
 405 410 415
 15 Leu Glu Lys Gly Glu Ala Asn Cys Thr Arg Gln His Met Gln Ala Ala
 420 425 430
 20 Met Tyr Tyr Ile Leu Thr Arg Gly Trp Ser Asp Asn Gly Asp Pro Met
 435 440 445
 Phe Asn Gln Thr Trp Ala Thr Phe Ala Met Asn Ile Ala Pro Ala Leu
 450 455 460
 25 Val Val Asp Ser Ser Cys Leu Ile Met Asn Leu Gln Ile Lys Thr Tyr
 465 470 475 480
 Gly Gln Gly Ser Gly Asn Ala Ala Thr Phe Ile Asn Asn His Leu Leu
 485 490 495
 30 Ser Thr Leu Val Leu Asp Gln Trp Asn Leu Met Arg Gln Pro Arg Pro
 500 505 510
 35 Asp Ser Glu Glu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Lys Leu Gly Ile Asn Phe
 515 520 525
 Lys Ile Glu Arg Ser Ile Asp Asp Ile Arg Gly Lys Leu Arg Gln Leu
 530 535 540
 40 Val Leu Leu Ala Gln Pro Gly Tyr Leu Ser Gly Gly Val Glu Pro Glu
 545 550 555 560
 Gln Ser Ser Pro Thr Val Glu Leu Asp Leu Leu Gly Trp Ser Ala Thr
 565 570 575
 45 Tyr Ser Lys Asp Leu Gly Ile Tyr Val Pro Val Leu Asp Lys Glu Arg
 580 585 590
 50 Leu Phe Cys Ser Ala Ala Tyr Pro Lys Gly Val Glu Asn Lys Ser Leu
 595 600 605
 Lys Ser Lys Val Gly Ile Glu Gln Ala Tyr Lys Val Val Arg Tyr Glu
 610 615 620
 55 Ala Leu Arg Leu Val Gly Gly Trp Asn Tyr Pro Leu Leu Asn Lys Ala
 625 630 635 640
 Cys Lys Asn Asn Ala Gly Ala Ala Arg Arg His Leu Glu Ala Lys Gly
 645 650 655
 60

Phe Pro Leu Asp Glu Phe Leu Ala Glu Trp Ser Glu Leu Ser Glu Phe
 660 665 670
 5 Gly Glu Ala Phe Glu Gly Phe Asn Ile Lys Leu Thr Val Thr Ser Glu
 675 680 685
 Ser Leu Ala Glu Leu Asn Lys Pro Val Pro Pro Lys Pro Pro Asn Val
 690 695 700
 10 Asn Arg Pro Val Asn Thr Gly Gly Leu Lys Ala Val Ser Asn Ala Leu
 705 710 715 720
 Lys Thr Gly Arg Tyr Arg Asn Glu Ala Gly Leu Ser Gly Leu Val Leu
 725 730 735
 15 Leu Ala Thr Ala Arg Ser Arg Leu Gln Asp Ala Val Lys Ala Lys Ala
 740 745 750
 20 Glu Ala Glu Lys Leu His Lys Ser Lys Pro Asp Asp Pro Asp Ala Asp
 755 760 765
 Trp Phe Glu Arg Ser Glu Thr Leu Ser Asp Leu Leu Glu Lys Ala Asp
 770 775 780
 25 Ile Ala Ser Lys Val Ala His Ser Ala Leu Val Glu Thr Ser Asp Ala
 785 790 795 800
 Leu Glu Ala Val Gln Ser Thr Ser Val Tyr Thr Pro Lys Tyr Pro Glu
 805 810 815
 30 Val Lys Asn Pro Gln Thr Ala Ser Asn Pro Val Val Gly Leu His Leu
 820 825 830
 35 Pro Ala Lys Arg Ala Thr Gly Val Gln Ala Ala Leu Leu Gly Ala Gly
 835 840 845
 Thr Ser Arg Pro Met Gly Met Glu Ala Pro Thr Arg Ser Lys Asn Ala
 850 855 860
 40 Val Lys Met Ala Lys Arg Arg Gln Arg Gln Lys Glu Ser Arg Gln
 865 870 875
 45 <210> 3
 <211> 13
 <212> PRT
 50 <213> Infectious bursal disease virus
 55 <400> 3
 Gly Arg Trp Ile Arg Thr Val Ser Asp Glu Asp Leu Glu
 1 5 10

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.